



**HAL**  
open science

# Étude de l'implication des cellules musculaires lisses vasculaires dans la distensibilité et le phénotype thrombotique dans des modèles murins

Karima Ait Aissa

► **To cite this version:**

Karima Ait Aissa. Étude de l'implication des cellules musculaires lisses vasculaires dans la distensibilité et le phénotype thrombotique dans des modèles murins. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0202 . tel-01749612

**HAL Id: tel-01749612**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749612>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

Circulation,  
métabolisme,  
nutrition



**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

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

par

**Karima AIT AISSA**

**Etude de l'implication des cellules musculaires lisses  
vasculaires dans la distensibilité et le phénotype  
thrombotique dans des modèles murins**

Date de soutenance : 7 décembre

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :**

**Pr Philippe NGUYEN** « PUPH, EA 3801, Reims »

**Dr Mary OSBORNE** « Chargé de recherche, Inserm U698 Paris »

**Examineurs:**

**Pr Denis WAHL** « PUPH, UMR-S 961, Nancy »

**Dr Zhenlin Li** « Directeur de recherche, UMPC, Paris »

**Dr Véronique REGNAULT** « Chargé de recherche, UMR\_S 961, Nancy »

**Dr Patrick LACOLLEY** « Directeur de recherche UMR\_S 961, Nancy »

---

-----  
UMR\_S 961 Risque cardiovasculaire, rigidité fibreuse et hypercoagulabilité



Je tiens à remercier le Dr **Véronique REGNAULT**, pour avoir encadré mon travail de thèse, son aide scientifique et humaine qu'elle m'a apportée durant ces 3 années. Je la remercie particulièrement pour tous ses conseils, sa disponibilité et pour tout ce qu'elle m'a appris.

Je tiens à remercier également, mon co-encadrant de thèse, le Dr **Patrick LACOLLEY** qui m'a fait l'honneur de m'accueillir et m'a permis de réaliser ces travaux dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissante pour sa confiance, ses remarques et son soutien scientifique.

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

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

Je tiens à remercier le Pr **Denis WAHL**, pour avoir fait l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examinateur. Je le remercie sincèrement pour ses conseils pour ce travail.

Je tiens à remercier le Dr **Zhenlin LI** d'avoir fait l'honneur de participer au jury et accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je tiens à remercier très sincèrement le Dr **Jean-Pierre MAX** pour son implication et son soutien technique dans ces travaux. Je voudrais saluer le soutien, l'engagement et la disponibilité dont il a fait preuve tout au long de mon doctorat et qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux de recherche.

Je tiens à remercier le Dr **Huguette LOUIS**, pour toute son aide scientifique et expérimentale pour la réalisation de mon projet de thèse. Je tiens tout particulièrement à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa patience et sa présence dans des moments très difficiles et stressants.

Je tiens à remercier le Dr **Simon N THORNTON** pour toutes les corrections en anglais et ses conseils scientifiques dans cette thèse.

Je tiens à remercier mon collègue de bureau et de travail, **Jérémy LAGRANGE**, pour son aide, son soutien et sa patience. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa bonne humeur et son esprit positif dans les moments où le moral n'y était.

Je tiens à remercier **Gina, Anna, Z'hor, Anne, Natalia, Audrey, Laurent, Elodie, Natalie**, et tous les membres du laboratoire d'Inserm U961 pour leurs soutiens, leurs bonnes humeurs et leurs conseils durant ces années de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma mère, mes frères, mon grand père et surtout mes oncles qui m'ont beaucoup soutenu et aidé durant ces 3 années comme dans toutes mes démarches, ma venue en France, mes études, mes ambitions... Cette thèse est un peu la votre, elle représente pour moi la reconnaissance de votre éducation car c'est grâce à vous si j'en suis là. C'est dans ces moments que celui là que je regrette le plus l'absence de mon père à qui je dois entièrement l'accomplissement de cette étape de ma vie.

Je remercie également tous mes amis, **Farid, Samia, Zohra, Nawal, Fahima, Dihia, Boubekeur, Katia, Hacène, Cathrine, Arnaud** ... et beaucoup d'autres qui m'ont soutenu durant ces 3 années de thèse.

# *Sommaire*





---

<b>Sommaire</b>	<b>1</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>6</b>
<b>Contexte</b>	<b>10</b>
<b>Etude bibliographique</b>	<b>12</b>
<b>I. Le vaisseau- paroi artérielle</b>	<b>12</b>
<b>I.1.1 Intima- Endothélium</b>	<b>12</b>
<b>I.1.1.1. Activité antithrombotique</b>	<b>13</b>
<b>a. Inhibition de l'adhésion-agrégation plaquettaire</b>	<b>14</b>
<b>b. Inhibition de la coagulation</b>	<b>14</b>
<b>c. Action fibrinolytique</b>	<b>15</b>
<b>I.1.2. Activité prothrombotique</b>	<b>15</b>
<b>I.1.3. Contrôle du tonus vasculaire</b>	<b>15</b>
<b>I.2 Média</b>	<b>18</b>
<b>I.2.1. Les cellules musculaires lisses vasculaires</b>	<b>18</b>
<b>I.2.2. Rôle des facteurs mécaniques sur la différenciation des CML</b>	<b>19</b>
<b>I.2.3. Marqueurs majeurs de différenciation dans les CML</b>	<b>21</b>
<b>I.3 Adventice</b>	<b>22</b>
<b>II. Hémostase</b>	<b>22</b>
<b>II.1. Hémostase primaire</b>	<b>23</b>
<b>a. Temps vasculaire</b>	<b>23</b>
<b>b. L'adhésion plaquettaire</b>	<b>23</b>
<b>c. L'activation plaquettaire</b>	<b>24</b>
<b>II.2 Les protéines de la coagulation</b>	<b>26</b>
<b>II.2.1 Les facteurs de la coagulation</b>	<b>26</b>
<b>II.2.2 Eléments cellulaires</b>	<b>29</b>
<b>II.2.3. Les inhibiteurs de la coagulation</b>	<b>30</b>
<b>II.3. Hémostase secondaire</b>	<b>31</b>
<b>II.3.1. Initiation</b>	<b>32</b>
<b>II.3.2. Amplification et propagation du système</b>	<b>33</b>
<b>II.4. Régulation</b>	<b>34</b>
<b>II.5. Lieu de synthèse des différents facteurs</b>	<b>34</b>
<b>II.6. L'hémostase chez le rat</b>	<b>35</b>
<b>III. Pathologies liées au vaisseau- vieillissement artériel</b>	<b>37</b>
<b>III.1 La rigidité artérielle</b>	<b>38</b>

<b>III.2. La coagulation dans l'hypertension</b>	<b>40</b>
<b>III.3. Implication des CML dans la cascade de coagulation</b>	<b>41</b>
<b>III.4. Effets cellulaires de la thrombine sur le remodelage vasculaire</b>	<b>42</b>
<b>III.5. La dysfonction endothéliale</b>	<b>46</b>
<b>III.6. La réactivité vasculaire</b>	<b>47</b>
<b>IV. Les modèles animaux</b>	<b>49</b>
<b>IV.1. Modèle d'hypertension</b>	<b>49</b>
<b>IV.1.1. Un modèle de rat spontanément hypertendu</b>	<b>49</b>
<b>IV.1.2. Rat spontanément hypertendu stroke prone</b>	<b>50</b>
<b>IV.1.3. Rat Dahl sensible au sel</b>	<b>50</b>
<b>IV.1.4. Modèles transgéniques d'hypertension</b>	<b>51</b>
<b>IV.1.5. Rat hypertendu Borderline</b>	<b>51</b>
<b>IV.2. Modèle de caractérisation de la différenciation du muscle lisse</b>	<b>52</b>
<b>Objectifs</b>	<b>54</b>
<b>Matériels et méthodes</b>	<b>56</b>
<b>I. Animaux</b>	<b>57</b>
<b>II. Prélèvement de sang et d'organes</b>	<b>57</b>
<b>III. Isolement des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses aortiques de rat</b>	<b>57</b>
<b>III.1. Culture cellulaire</b>	<b>58</b>
<b>III.1.1. Milieux de culture</b>	<b>58</b>
<b>III.1.2. Croissance cellulaire</b>	<b>59</b>
<b>III.2. Immunocytochimie</b>	<b>59</b>
<b>IV. Mesure de la génération de thrombine (Thrombinographie)</b>	<b>59</b>
<b>IV.1. Définition générale de la technique</b>	<b>59</b>
<b>IV.2. Préparation des spécimens plasmatiques (PRP-PPP-Pool de PPP)</b>	<b>60</b>
<b>IV.3. Conditions de la réalisation du test</b>	<b>61</b>
<b>IV.3.1. Les paramètres thrombinographiques</b>	<b>61</b>
<b>IV.1.2 Mesure de la génération de thrombine au niveau du plasma riche et pauvre en plaquettes</b>	<b>63</b>
<b>IV.1.3. Mesure de la génération de thrombine à la surface de la paroi aortique, des CML et CE</b>	<b>64</b>
<b>IV.1.3.1. Anneaux aortiques de rat</b>	<b>64</b>
<b>IV.1.3.2. CML et CE</b>	<b>64</b>
<b>V. Mesure des facteurs pro- et anticoagulants</b>	<b>66</b>

V.1 Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA)	66
V.2. Mesure de l'activité du facteur tissulaire	67
V.3. Mesure de l'activité de TFPI	68
V.4. Dosage de la prothrombine (facteur II)	69
V.5. Dosage du fibrinogène (facteur I)	69
V.6. Dosages des complexes Thrombine/Anti-thrombine (TAT)	69
V.7. Dosage de l'antithrombine	70
VI. Quantification de l'expression génique par PCR en temps réel (PCRq)	70
VI.1 Extraction des ARN	70
VI.2. Transcription reverse (RT)	71
VI.3. Réaction de PCR quantitative en temps réel (PCRq)	71
VII. La fonction vasculaire chez l'animal	72
VII.1. Réactivité vasculaire sur carotide et mésentère de souris	72
VII.2. Réactivité vasculaire sur carotide de rat	72
Résultats	74
I. Analyse hématologique	75
II. Etude de la coagulation <i>in vitro</i>	76
II.1. La coagulation au niveau du plasma	76
II.1.1. Génération de thrombine dans le plasma	76
II.1.2. Quantification des facteurs de coagulation dans le plasma	81
II.1.3. Effet du FT sur le taux de thrombine générée dans du plasma	83
II.1.4. Effet de la prothrombine et du TFPI sur l'ETP <i>in vitro</i>	84
II.2.5. Expression hépatique des facteurs de coagulation FII et FV chez le rat SHR	85
II.2. La coagulation au niveau pariétal	86
II.2.1. Génération de thrombine à la surface d'anneaux artériels	87
II.2.2. Génération de thrombine à la surface d'anneaux aortiques	89
II.2.3. Génération de thrombine à la surface des CE et des CML vasculaires	91
II.2.3.1. Effet du détachement des cellules par la trypsine sur l'activité procoagulante	91
II.2.3.2. Effet de la concentration en FT sur la génération de thrombine à la surface des CML	92
II.2.3.3. Effet de la PCa et du TFPI sur les paramètres thrombinographiques des CML	93
II.2.4. Dosage des facteurs hémostatiques pariétaux	94
III. Interaction coagulation et remodelage vasculaire	95
III.1. Expression des récepteurs de la thrombine par les CML vasculaires	96

<b>III.2. Effet de la thrombine sur la réactivité vasculaire</b>	<b>97</b>
<b>III.3. Etude du rôle des CML dans la rigidité artérielle</b>	<b>98</b>
<b>III.3.1. Au niveau de l'artère carotide</b>	<b>98</b>
<b>III.3.2. Au niveau de l'artère mésentérique</b>	<b>101</b>
<b>Discussion</b>	<b>105</b>
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>114</b>
<b>Références</b>	<b>117</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>138</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>141</b>
<b>Liste des publications</b>	<b>142</b>

*Liste  
des abréviations*



---

<b>Ach</b>	Acétylcholine
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>ADPase</b>	Adénosine diphosphatase
<b>AKT</b>	Protein kinase B
<b>AMPC</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>AT</b>	Antithrombine
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>ATPase</b>	Adénosine triphosphatase
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin (Albumine bovine sérique)
<b>CE</b>	Cellule endothéliale
<b>CML</b>	Cellule musculaire lisse
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle's medium
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>EDRF</b>	Endothelial derived relaxing factor (Facteur de relaxation dérivé de l'endothélium)
<b>EDTA</b>	Ethylene diamine tetraacetic acid (Acide éthylène diamine tétracétique)
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor (Facteur de croissance épidermique)
<b>EPCR</b>	Endothelial protein C receptor (Récepteur endothelial de la protéine C)
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinases (Kinases régulatrices du signal extracellulaire)
<b>ETP</b>	Endogenous thrombine potential (le potentiel de thrombine endogène)
<b>FAK</b>	Focal adhesion kinase (Kinase de l'adhésion focale)
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor (Facteur de croissance du fibroblaste)
<b>FII</b>	Prothrombine
<b>FN</b>	Fibronectine
<b>FT</b>	Facteur tissulaire
<b>FVa</b>	Facteur V activé
<b>FXa</b>	Facteur X activé
<b>GAGs</b>	Glycosaminoglycanes
<b>GDP</b>	Guanosine diphosphatase
<b>Gla</b>	Acide-g-carboxyglutamique
<b>GP</b>	Glycoprotéine
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glycogen synthase kinase-3
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphatase

---

<b>HUVEC</b>	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Cellules endothéliales du cordon ombilicale humain)
<b>ICAM</b>	Intercellular adhesion molecule (Molécule d'adhésion intercellulaire)
<b>IL</b>	Interleukine
<b>ILK</b>	Integrin-linked kinase (Kinase liée à l'intégrine)
<b>JAK/STAT</b>	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (Kinase Janus/ transducteur de signal et activateur de transcription)
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinases
<b>KHPM</b>	Kininogène de haut poids moléculaire
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MEK</b>	MAPK/ERK kinase
<b>MEKK</b>	MAPK/ERK kinase kinase
<b>MK2</b>	MAP kinase-activated protein kinase 2
<b>MKK</b>	MAPK kinase
<b>MLK</b>	Mixed-lineage kinase
<b>MMPs</b>	Métalloprotéases
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>PAI-1</b>	Plasminogen activator inhibitor 1 (L'activateur de l'inhibiteur du plasminogène)
<b>PAR</b>	Protease-activated receptor (Récepteur activé par protéase)
<b>PC</b>	Phosphatidylcholine
<b>PCa</b>	Protéine C activée
<b>PCI</b>	Protein C Inhibitor (Inhibiteur de la protéine C)
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor (Facteur de croissance dérivé des plaquettes)
<b>PDH2</b>	Prostaglandine H2
<b>PDK</b>	3-phosphoinositide-dependent protein kinase (Protéine kinase dépendante de 3-phosphinositide)
<b>PDP</b>	Plasma dépourvu en plaquettes
<b>PECAM-1</b>	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
<b>PGI2</b>	Prostacycline
<b>PHE</b>	Phényléphrine
<b>PIP2</b>	Phosphatidyl inositol diphosphate
<b>PIX</b>	P21-activated kinase-interacting exchange factor



---

<b>PK</b>	Prékallikérine
<b>PKC</b>	Protein kinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PPA</b>	Phospholipids procoagulant activity (Activité des phospholipides procoagulante)
<b>PPP</b>	Plasma pauvre en plaquettes
<b>PRP</b>	Plasma riche en plaquettes
<b>PS</b>	Protéine S
<b>PSer</b>	Phosphatidylsérine
<b>PSGL-1</b>	P-selectin glycoprotein ligand 1 (Ligand de la glycoprotéine Selectine)
<b>RGD</b>	Arginine–Glycine–Acide aspartique
<b>ROCK</b>	Rho-kinase
<b>SFK</b>	Src family kinases (Famille des kinases Src)
<b>SM-MHC</b>	Smooth muscle myosin heavy chain (La chaîne lourde de la myosine du muscle lisse)
<b>SNP</b>	Sodium Nitropussiate
<b>SRF</b>	Serum response factor (Facteur de réponse au sérum)
<b>SRFSMKO</b>	Serum response factor smooth muscle knock out (Invalidé pour SRF)
<b>SVF</b>	Sérum de veau foetal
<b>TF</b>	Tissue factor (Facteur tissulaire)
<b>TFPI</b>	Tissue factor pathway inhibitor (L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Tumor necrosis factor- $\beta$ (Facteur tumoral de nécrose $\beta$ )
<b>TM</b>	Thrombomoduline
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor-alpha (Facteur tumoral de nécrose $\alpha$ )
<b>t-PA</b>	tissue Plasminogen activator (Activateur tissulaire du plasminogène)
<b>TXA2</b>	Thromboxane A2
<b>UK</b>	Urokinase
<b>VCAM</b>	Vascular cell adhesion molecule (Molécule vasculaire d'adhésion cellulaire)
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor (Facteur de croissance endothéliale vasculaire)
<b>VP</b>	Vésicules phospholipidiques
<b>vWF</b>	Von Willebrand factor (Facteur de von Willebrand)
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ -Smooth muscle actin (Actine $\alpha$ du muscle lisse)



*Contexte*



La rigidité artérielle et la pression pulsée ont une valeur prédictive dans la survenue des événements cardiovasculaires (CV), indépendamment des autres facteurs de risque (Kass et al. 2005 ; Lacolley 2009 ; Safar et Lacolley 2009). Les altérations de la rigidité artérielle ne peuvent être attribuées aux seules modifications du niveau de pression et/ou aux contenus en élastine et collagène. D'autres déterminants comme les attachements cellules-matrice, les intégrines, le stress oxydant et la fonction endothéliale pourraient être impliqués.

Sur le plan de la coagulation, le rôle de la paroi artérielle et du flux soulevé par Virchow ne doivent pas être minimisés. Notre hypothèse est que les cellules musculaires lisses vasculaires (CML) interviennent dans la formation mais aussi l'inhibition de la thrombine. En effet, les CML possèdent plusieurs protéines impliquées dans les systèmes physiologiques d'inhibition de la génération de thrombine : l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), le récepteur endothélial pour la protéine C (EPCR) et la thrombomoduline (Bretschneider et al. 2007; Caplice et al. 1998 ; Rabausch et al. 2005). La capacité des CML à servir de support pour la génération de thrombine (Flynn et al. 1997 ; Pathak et al. 2006; Campbell et al. 2009 ; Vidwan et al. 2010) nous ont conduit à envisager des études de relations entre remodelage vasculaire et coagulation. Une des propriétés majeures de la thrombine est le caractère pléiotropique de ses effets dans le compartiment sanguin et dans le compartiment pariétal.

Un lien causal entre hypercoagulabilité et pathologie CV est suggéré par l'efficacité des traitements anticoagulants dans les maladies coronaires et les thromboses artérielles. L'âge induit des modifications structurales et moléculaires qui se traduisent par une rigidité progressive de la paroi. L'âge est également associé à une augmentation des événements thrombotiques. Toutefois, ces 2 facteurs de risque sont le plus souvent étudiés indépendamment l'un de l'autre. Au laboratoire une corrélation significative entre la forme libre du TFPI et la vitesse de l'onde de pouls (VOP) ou la pression pulsée avait récemment été mise en évidence chez la femme ménopausée indemne de toute complication cardiovasculaire. Au plan fondamental, nous avons démontré que des déformations pulsatiles augmentent la synthèse et sécrétion de TFPI par des CML aortiques humaines et que cette augmentation est dépendante de l'amplitude des déformations (Regnault et al. 2011).

Plusieurs données cliniques et expérimentales suggèrent des modifications de la balance hémostatique liées à des modifications quantitatives de facteurs individuels procoagulants ou anticoagulants en réponse à une élévation de la pression artérielle. Toutefois, il n'a pas été clairement établi si l'hypertension conférerait un état prothrombotique dans le sang et dans la paroi.



*Etude  
bibliographique*





## I. Le vaisseau- paroi artérielle

La paroi se compose de trois tuniques concentriques distinctes. A partir de la lumière vasculaire, se trouvent l'intima, la media puis l'adventice (figure 1)

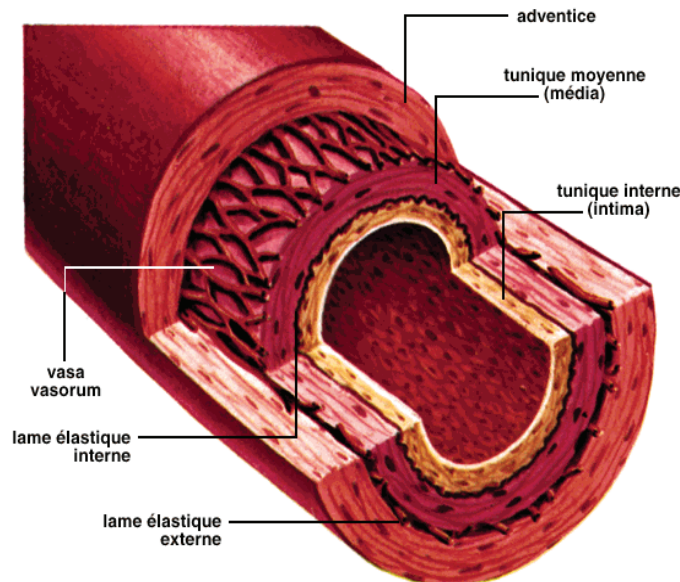


Figure 1 : Structure d'une artère.

### I.1 Intima- Endothélium

L'intima est constituée successivement de l'endothélium, de la membrane basale, de la couche sous-endothéliale et de la limitante élastique interne (Figure 2).

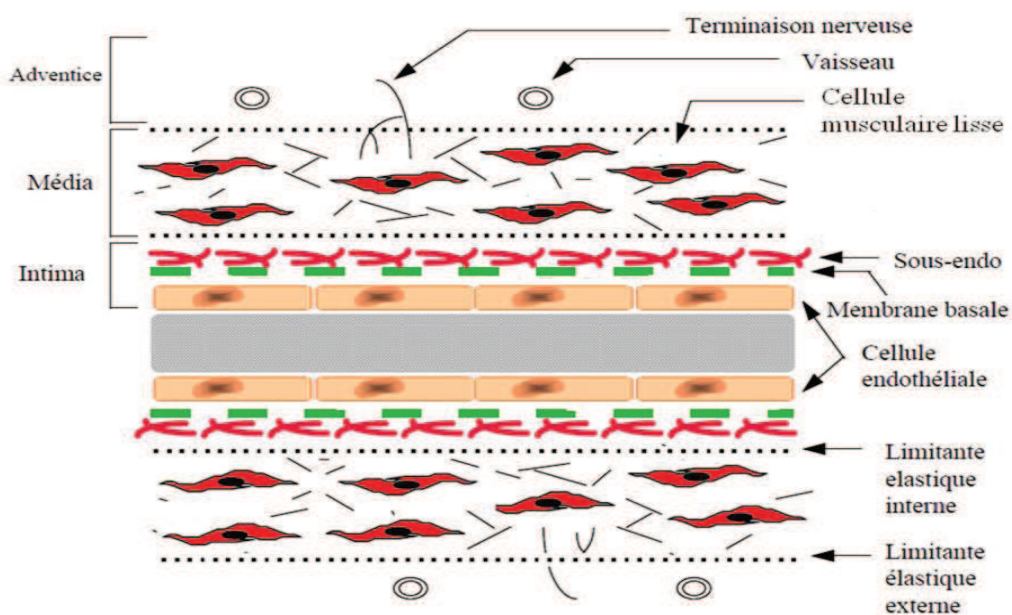


Figure 2 : coupe longitudinale de la paroi artérielle

Les cellules endothéliales (CE) tapissent la surface interne de la paroi et forment une couche continue en contact avec le sang. Il s'agit de cellules aplaties (0,3 à 0,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, environ 100  $\mu\text{m}$  de long et 10  $\mu\text{m}$  de large), dont le noyau en position centrale est d'autant plus saillant que la pression luminale est élevée. Elles sont sous forme de losange et leur juxtaposition forme un tapis arrangé en mosaïque. Leur grand axe est allongé dans le sens de l'écoulement sanguin (Tedgui et Levy, 1994). Des expériences réalisées sur des CE en culture confirment que leur orientation est déterminée par les forces de cisaillement appliquées à leur surface (Levesque et al. 1985).

La surface luminale des CE est recouverte d'une mince couche de glycosaminoglycanes (GAGs) chargés négativement, formant le glycocalyx. Son rôle essentiel est de réaliser l'anti-thrombogénicité de la surface endothéliale.

La lame basale est composée de microfibrilles de collagène de type IV (environ 5 nm de diamètre) et de glycoprotéines. Un espace amorphe d'environ 40 nm d'épaisseur, la sépare de la membrane plasmique de la CE. Elle constitue un support et un guide lors de la régénération de l'endothélium (Levesque et al. 1985).

L'endothélium présente des différences histologiques et fonctionnelles selon le type de vaisseau sanguin dont il est constitutif (Thorin et al. 1997). Trois types d'endothélium ont été décrits : continu, fenêtré et discontinu (sinusoïdal). L'endothélium continu se trouve dans les gros vaisseaux, les artérioles et la plupart des veinules. L'endothélium fenêtré existe dans les organes dont la fonction requiert un échange des fluides particulièrement efficace. L'endothélium discontinu se situe quant à lui dans les régions plus restreintes telles que le foie, la rate et la moelle osseuse. Loin d'être un simple filtre, l'endothélium régule un grand nombre de fonctions physiologiques (Barlovatz-Meimon et Adolphe 2003).

### **I.1.1. Activité antithrombotique**

Une des fonctions principales de l'endothélium se situe au niveau de l'hémostase, par son implication dans les processus de coagulation et de fibrinolyse.

Les CE présentent une surface thromborésistante. Elles produisent des facteurs jouant un rôle dans l'inhibition de la coagulation, permettant ainsi sa régulation au niveau physiologique. Ce rôle peut être abordé à trois niveaux :

#### **a. Inhibition de l'adhésion-agrégation plaquettaire**

L'endothélium synthétise la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) qui est un puissant antiagrégant et vasodilatateur (Michiels 2003 ; Agarwal et Gomberg-Maitland 2011 ; Kawabe et al. 2010).

Celle-ci inhibe l'adhésion des plaquettes activées par augmentation de leur contenu en adénosine monophosphate cyclique (AMPC).

L'endothélium synthétise également le monoxyde d'azote (NO). Celui-ci, par son activité de facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF pour *endothelial derived relaxing factor*) sur le tonus vasculaire, induit le relâchement des cellules musculaires lisses (CML) et inhibe ainsi que le recrutement et l'adhésion des plaquettes (Vanhoute 2010 ; Freedman 2008).

Enfin, la présence d'ecto-enzymes de type adénosine diphosphatase (ADPase) et adénosine triphosphatase (ATPase) à la surface de l'endothélium permet de neutraliser rapidement l'adénosine diphosphate (ADP) et l'adénosine triphosphate (ATP) libérées par les plaquettes lorsque ces dernières sont activées (Yamamizu et Yamashita 2011).

### **b. Inhibition de la coagulation**

La CE régule la coagulation par divers mécanismes complémentaires : 1) les CE sont riches en GAGs, des polysaccharides biochimiquement apparentés à l'héparine. D'une part, elles potentialisent l'action de l'antithrombine (AT) dans l'inhibition des facteurs activés (sérines protéases) de la coagulation en interagissant avec l'AT et le second cofacteur de l'héparine. Et d'autre part, elles accélèrent, par conséquence, l'inhibition de la thrombine (Taylor et Gallo 2006 ; Rau et al. 2007) ; 2) l'expression et la sécrétion de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI pour *tissue factor pathway inhibitor*) qui inhibe la voie extrinsèque de la coagulation (Maroney et Mast 2008) ; 3) l'expression des protéines impliquées dans le système anticoagulant dynamique de la protéine C activée (PCa) telles que la thrombomoduline (TM) et le récepteur endothélial pour la protéine C (EPCR pour *Endothelial protein C receptor*) (Van de Wouwer et al. 2004) ; 4) la synthèse de la protéine S (qui joue comme cofacteur de la PCa pour l'inactivation du facteur Va et VIIIa de la coagulation et qui a un effet anticoagulant propre) (Dahlbäck 2007).

### **c. Action fibrinolytique**

La CE produit l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), et exprime des récepteurs à la fois pour le t-PA, l'urokinase (UK) et le plasminogène (Cromer et al. 2011 ; Michiels 2003 ; Collen et Lijnen 2009). Elle permet ainsi de focaliser l'action de ces enzymes sur la transformation du plasminogène en plasmine (responsable de la dissolution du dépôt fibrineux formé à la surface vasculaire) en présence du t-PA et de l'UK. Elle protège également ces enzymes de l'action spécifique des inhibiteurs comme l' $\alpha_2$ -antiplasmine, l' $\alpha_2$ -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).

### **I.1.2. Activité prothrombotique**

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 synthèse des molécules pro-agrégantes, procoagulantes et antifibrinolytiques, ou indirecte par l'expression des molécules d'adhérence pouvant impliquer des cellules circulantes à activité thrombogène.

### **I.1.3. Contrôle du tonus vasculaire**

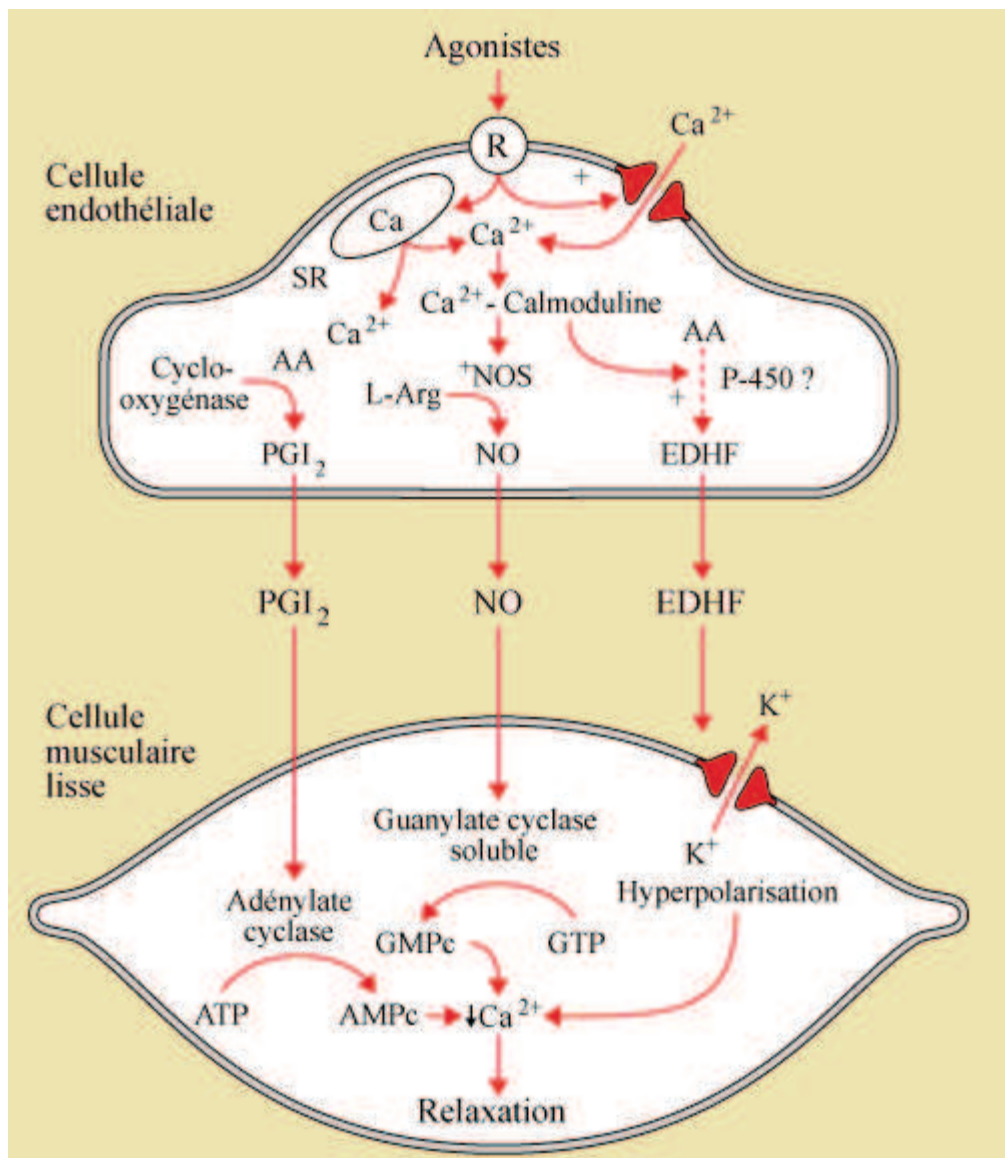
La CE module le tonus et la vasomotricité de la CML sous-jacente en libérant de nombreux facteurs de relaxation et de contraction. Dans les conditions normales, la libération des facteurs de relaxation, en particulier le NO, prédomine sur celle des facteurs de contraction (Figure 3).

Le NO est synthétisé dans les CE à partir de l'arginine sous l'action de la NO synthétase qui catalyse son oxydation NADPH et oxygène-dépendante, en NO et L-citrulline (Palmer et al. 1988 ; Schmidt et al. 1988 ; Sakuma et al. 1988). Il existe au moins 3 isoformes de la NO synthétase codées par des gènes distincts (Moncada et al. 1991 ; Förstemann et al. 1993 ; Birks et al. 1997). Une grande proportion du NO produit au niveau des parois vasculaires saines est d'origine endothéliale (Moncada et al. 1991).

Très labile, le NO diffuse, d'une part, vers la lumière vasculaire où il exerce un rôle antiagrégant et anti-adhérent sur les plaquettes circulantes et, d'autre part, vers le pôle basal de l'endothélium où il provoque une relaxation des CML en augmentant le taux intracellulaire de guanosine mono phosphate cyclique (GMPc) (Ignarro et al. 1989).

Le facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF) dont la nature chimique n'est toujours pas connue, stimule l'ouverture des canaux potassiques des CML entraînant ainsi leur hyperpolarisation et leur relaxation (Nagao et Vanhoutte 1992).

Il semble exister plusieurs EDHFs, qui pourraient correspondre dans certains vaisseaux aux acides époxyeicosatriénoïques, métabolites formés à partir de l'acide arachidonique par l'action du cytochrome P450 (Campbell et al. 1996 ; Miura & Gutterman 1998).



**Figure 3** : Libération de facteurs de relaxation d'origine endothéliale. L'activation des récepteurs endothéliaux induit un influx de calcium dans le cytoplasme des CE. Lorsque les agonistes activent les CE, une augmentation de l'inositol phosphate ( $IP_3$ ) pourrait contribuer à l'augmentation du calcium ( $Ca^{2+}$ ) cytoplasmique en induisant sa libération par le réticulum endoplasmique (RE). Après interaction avec la calmoduline, le  $Ca^{2+}$  active la NO synthétase (NOS) et entraîne la libération de facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF). L'augmentation du  $Ca^{2+}$  accélère également la formation de prostacycline ( $PGI_2$ ) à partir de l'acide arachidonique (AA) par la voie de la cyclooxygénase. Le NO provoque la relaxation en activant la formation de guanosine mono phosphate cyclique (GMPC) à partir du guanosine triphosphate (GTP). La prostacycline provoque la relaxation en activant la formation d'adénosine mono phosphate cyclique (AMPc) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP). L'EDHF provoque l'hyperpolarisation et la relaxation en ouvrant les canaux potassiques ( $K^+$ ) (d'après Vanhoutte et al, 1995).

L'action vasodilatatrice de la PGI<sub>2</sub>, dérivée de l'acide arachidonique, s'opère par une élévation du taux intracellulaire d'AMPc. Les effets de la PGI<sub>2</sub> sont intimement liés à ceux du NO. La PGI<sub>2</sub> facilite la libération endothéliale de NO qui, en retour, potentialise l'action de la PGI<sub>2</sub> au niveau musculaire lisse par inhibition de la phosphodiesterase (Delpy et al. 1996). Toutefois, la contribution de la PGI<sub>2</sub> à la relaxation endothélium-dépendante est beaucoup moins importante que celle du NO (Lüscher & Vanhoutte 1990 ; Shimokawa et al. 1995).

La vasoconstriction endothélium-dépendante résulte de la libération de substances telles que la prostaglandine H<sub>2</sub> (Auch-Schwelk et al. 1990; Tesfamariam et al. 1990), les radicaux libres dérivés de l'oxygène (Shimizu et al. 1994), l'angiotensine II, le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) et l'endothéline-1. L'endothéline-1 augmente l'action d'autres substances vasoactives telles que l'angiotensine II, la norépinephrine, la sérotonine, et participe à l'activation des leucocytes et des plaquettes (Lüscher et al. 1996).

## **I.2 Média**

Délimitée par les lames limitantes élastiques interne et externe, la média est essentielle dans la détermination des propriétés élastiques de la paroi. Elle ne contient généralement que des CML vasculaires, s'appuyant sur une matrice extracellulaire (MEC) composée en majeure partie d'élastine, de collagène et de protéoglycanes (Wolinsky et Glagov 1967). La média des artères élastiques se présente comme un empilement de faisceaux (ou feuillets) musculo-élastiques (Clark et Glagov 1985). Chaque feuillet consiste en un groupe de CML et de fibres de collagène délimitées par des fibres élastiques orientées suivant le grand axe des cellules (Figure 2). Le nombre de ces feuillets augmente avec le diamètre artériel et le poids (Wolinsky et Glagov 1967). Cette disposition permet une distribution plus ou moins uniforme des contraintes mécaniques au sein des vaisseaux.

### **I.2.1. Les cellules musculaires lisses vasculaires (CML)**

Les CML sont des cellules peu différenciées issues du mésoderme. Elles sont arrangées de façon concentrique. Elles sont généralement fusiformes et uninuclées 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. Les CML transforment cette stimulation mécanique en signaux intracellulaires par des «mécano-capteurs" comme les intégrines, les récepteurs tyrosine

kinases et les canaux ioniques (Haga et al. 2007). Il a été démontré que la mécanotransduction des signaux *via* les intégrines, est responsable de la modulation du phénotype de CML et de leurs fonctions régulant ainsi la différenciation, la prolifération, l'apoptose, la migration et la réorganisation de la MEC. En particulier, la mécanotransduction cellulaire induit une expression rapide et transitoire de molécules régulatrices telles que des facteurs de transcription (c-Fos, Sp1, Egr1), des molécules de signalisation (JNK, P38, ERK) des facteurs de croissance (FGF-2, PDGF) et des protéines du cytosquelette (Caldesmon, SM-MHC) (Chapman et al. 2000 ; Cheng et al. 2007 ; Albinson et Hellstrand 2007 ; Qu et al. 2007).

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 activé par protéase de type 1 (PAR1 *pour protease-activated receptor 1*) (Nguyen et al. 2001). Nous avons récemment montré que l'application d'un stretch mécanique (10%, 1 Hertz) pour plus de 1 heures augmente la production et la sécrétion du TFPI par les CML vasculaires *in vitro* (Regnault et al. 2011). Ainsi, les forces d'étirement mécaniques cycliques pourraient moduler l'expression de protéines de coagulation au niveau des CML vasculaires, et par conséquence, la génération de thrombine à leur surface.

### **I.2.2. Rôle des facteurs mécaniques sur la différenciation des CML**

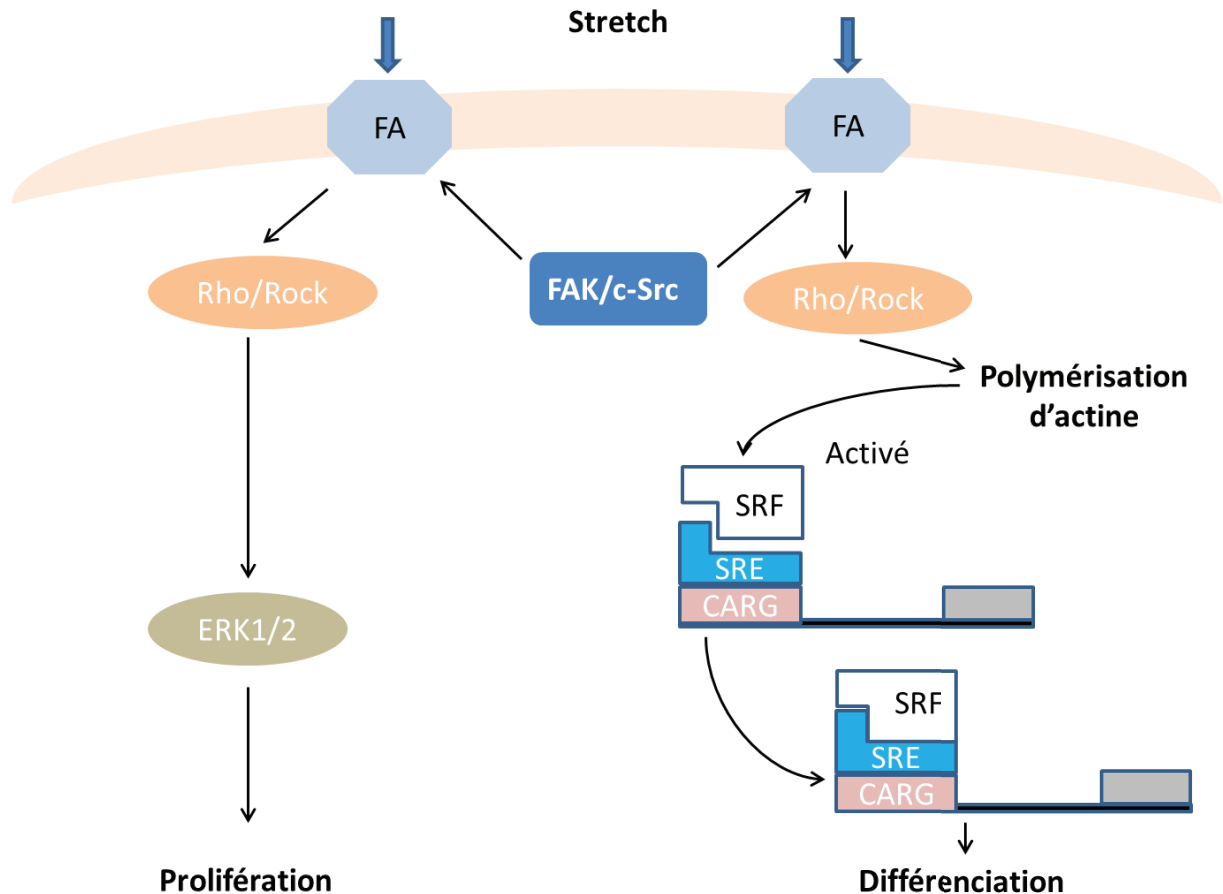
Plusieurs facteurs influencent la différenciation des CML : les interactions cellulaires notamment avec les CE, la MEC ainsi que les facteurs hémodynamiques et/ou des facteurs mécaniques. La signalisation de la différenciation en réponse aux contraintes mécaniques s'effectue en parallèle à l'activation de la voie de « mitogen-activated protein kinases » (MAP kinases) (Halka et al. 2008). Ainsi, il a été montré que l'étirement actif (direct ou indirect) agit sur des protéines comme les « focal adhesion kinase » (FAK) et « Proto-oncogene tyrosine-protein kinase » (Src) lors de l'adhésion focale des CML. Dans les artères, Src et FAK sont phosphorylées au niveau des intégrines, et sont essentielles à la (dé) polymérisation de l'actine. Ceci peut être régulé par la voie Rho/ « Rho-associated protein kinase » (ROCK). La voie Rho/ROCK induite par l'étirement va ainsi transmettre un signal du cytoplasme au noyau en entraînant l'activation du « serum response factor » (SRF), un facteur de transcription à domaine MADS, exprimé de manière ubiquitaire et notamment au niveau des fibres musculaires squelettiques. Il se fixe à l'ADN sous forme d'homodimère, sur des régions consensuelles, souvent régulatrices de gènes: les boîtes CArG, dont le motif est généralement CC(A/T)6GG. SRF est majoritairement impliqué dans la régulation des gènes nécessaires au développement et à la différenciation musculaire (Landerholm et al. 1999). SRF intervient

dans des processus aussi nombreux que variés. Il est au carrefour de différentes voies de signalisation qui lui permettent d'adapter son niveau d'expression et le choix de ses cofacteurs en fonction du contexte cellulaire. Dans les CML différenciées, SRF est impliqué dans le contrôle des gènes du cytosquelette, notamment l' $\alpha$ -actine du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA pour  *$\alpha$ -smooth muscle actin*), la chaîne lourde de la myosine du muscle lisse (SM-MHC pour *smooth muscle-myosin heavy chain*), les calponines, la troponine, la dystrophine ou la desmine (Mc Donald et Owens 2007). D'autre part, les signaux qui impliquent le cytosquelette jouent un rôle majeur dans la régulation de l'activité SRF sur ses gènes cibles (Olson et Nordheim 2010).

Parallèlement, l'activation des « extracellular signal-regulated kinases 1/2 » (ERK1/2) de la famille des MAP kinases par la voie Rho/ROCK induit la prolifération des cellules (Figure 4). Ainsi, la croissance induite par l'étirement dans un phénotype contractile préservé est le fruit d'une double activation des voies de signalisation régulant la croissance et la différenciation (Hellstrand et al. 2005; Wozniak et al. 2009).

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





**Figure 4 :** Différenciation et croissance des CML induit par l'étirement.

Les CML sont constamment exposées aux contraintes mécaniques. Comparativement aux CE, l'étirement cyclique de la pression pulsée joue un rôle essentiel dans la modulation phénotypique des CML. La voie de signalisation de l'intégrine-Rho/ROCK induit une polymérisation d'actine, puis l'activation de facteurs (SRF) induit la transcription des gènes des marqueurs de la différenciation des CML. La différenciation maintient également le phénotype contractile des CML assurant sa fonction principale sur le plan mécanique. Par la voie de signalisation d'intégrine-FAK/Src, l'étirement cyclique peut aussi induire la prolifération via l'activation de la famille MAP kinases telles que ERK1/2. Adaptée d'après (Halka et al. 2008)

### I.2.3. Marqueurs majeurs de différenciation dans les CML

L'état différencié de la cellule se caractérise ainsi par la présence de filaments contractiles de forme identique à celle observée dans les myocytes cardiaques, mais moins nombreux et moins organisés. L'état différencié de la CML se caractérise au niveau biochimique par l'expression de protéines contractiles, de protéines du cytosquelette et de protéines membranaires et matricielles qui lui permettent d'assurer sa fonction de base qui est la contraction. L'ensemble de ces protéines sert à caractériser le niveau de différenciation de la CML (Owens 1995).

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

### **I.3 Adventice**

L'importance de l'adventice est très variable selon la localisation. Dans l'aorte, l'adventice est peu développée, à l'inverse de l'artère mésentérique ou de l'artère rénale. En général, l'adventice est composée de faisceaux de fibres en collagène et est traversée de vasa vasorum et de filets de nerfs. Elle contient également, chez l'Homme, quelques fibres élastiques épaisses et des fibroblastes.

Les vasa vasorum n'existent que dans les vaisseaux de diamètre supérieur à 200  $\mu$ m. Ils restent confinés dans l'adventice, tant que l'épaisseur de la média ne dépasse pas 0,5 mm, ce qui correspond chez les mammifères à des artères de plus de 29 unités lamellaires. Au-delà, les vasa vasorum pénètrent dans la partie externe de la media. Il existe une exception toutefois, l'aorte abdominale humaine a une media de plus de 0,5 mm d'épaisseur qui n'est pas vasculaire.

Le réseau lymphatique adventiciel assure l'évacuation des substances provenant du sang et transportées à travers la paroi.

Les fibres nerveuses vasomotrices de la paroi participent au contrôle du calibre vasculaire en provoquant essentiellement dans les artères de petit calibre soit une vasoconstriction soit une vasodilatation. Elles sont confinées dans l'adventice, à la limite de la media. La stimulation nerveuse des CML se fait par action directe des nerfs sur les myocytes situés dans la couche externe de la media, puis par transmission de l'excitation aux cellules sous-jacentes par couplage électrique entre les cellules. (cité par Tedgui et Levy 1994).

## **II. Hémostase**

L'hémostase regroupe un ensemble de processus complexes, et interdépendants, nécessitant la coopération de la paroi vasculaire, des cellules sanguines et des protéines plasmatiques ayant pour objectif de rétablir le flux sanguin en cas de thrombose, mais également de colmater les fuites pouvant apparaître dans le circuit vasculaire. Elle se déroule **en trois grandes étapes : l'hémostase primaire** qui dure 3 à 5 minutes avec formation d'un agrégat plaquettaire, **l'hémostase secondaire (ou la coagulation sanguine) qui est** subdivisée en voies extrinsèque et intrinsèque, de 5 à 10 minutes, qui permet la consolidation de cet agrégat par de la fibrine **et la fibrinolyse** qui permet en 48 à 72 heures la dégradation du caillot et le retour à une circulation sanguine normale.

Le terme "coagulation", plus restrictif, sous entend l'ensemble des phénomènes qui permettent la formation du caillot, à savoir hémostases primaires et secondaires.

L'ensemble de ces phénomènes doivent être très finement ajustés pour permettre l'équilibre entre les réactions pro et anti-coagulantes : la balance hémostatique.

### **II.1. L'hémostase primaire**

C'est le processus aboutissant à la formation d'un agrégat plaquettaire (ou thrombus blanc, ou encore clou plaquettaire).

Elle est suffisante pour arrêter l'hémorragie au niveau des petits vaisseaux, insuffisante mais indispensable pour freiner l'hémorragie au niveau des plus gros vaisseaux. Le clou plaquettaire est fragile et devra être consolidé par le réseau de fibrine au cours de l'hémostase secondaire.

#### **a. Temps vasculaire**

Il y a au niveau du vaisseau lésé une vasoconstriction immédiate, tout d'abord passive, lié à l'élasticité de la paroi, puis active, par contraction des fibres musculaires lisses par réflexe sympathique, accrue par la libération de substances humorales: adrénaline, sérotonine. Cette vasoconstriction peut réduire jusqu'à 30% le calibre du vaisseau lésé, diminuant la fuite sanguine et ralentissant le débit sanguin, ce qui favorise les interactions entre plaquettes et endothélium.

## b. L'adhésion plaquettaire

Elle s'effectue au sous endothélium exposé, en faisant intervenir essentiellement la GP Ib/ IX de la membrane plaquettaire, le vWF, et certaines structures du sous endothélium, surtout les fibres de collagène de type III et IV et les micro-fibrilles. Le vWF sert de pont entre la plaquette et le sous endothélium. Il y a d'abord fixation du vWF aux fibres de collagène. Il en résulte une modification de la configuration spatiale de la molécule de vWF et sur ce facteur modifié vient s'amarrer la plaquette par l'intermédiaire de la GP Ib/IX comme elle peut se fixer directement sur l'intégrine GPIa IIa (Figure 5).

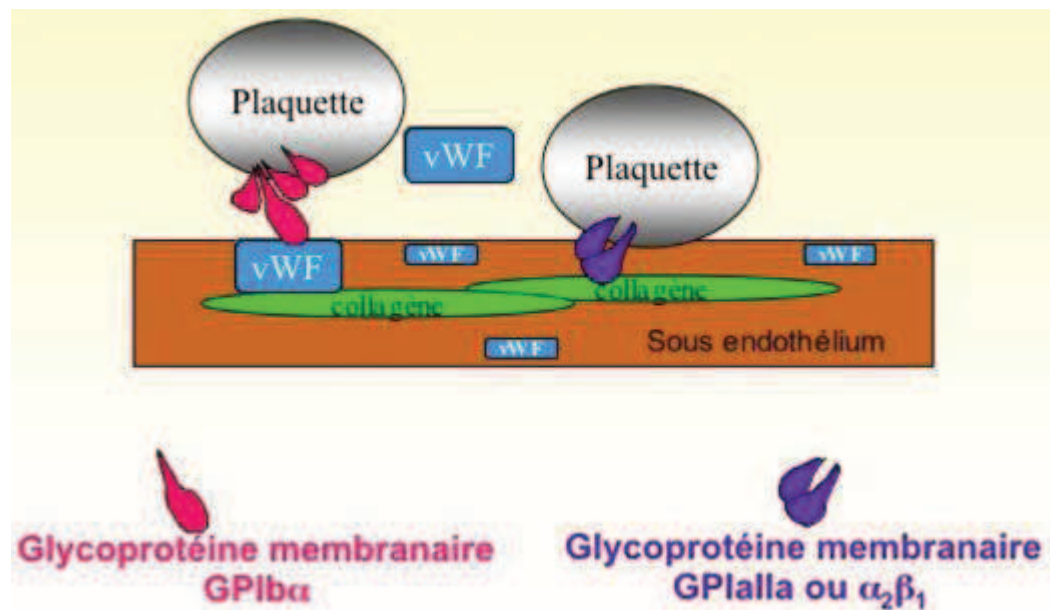


Figure 5 : Adhésion plaquettaire (d'après M. Vasse, 2007)

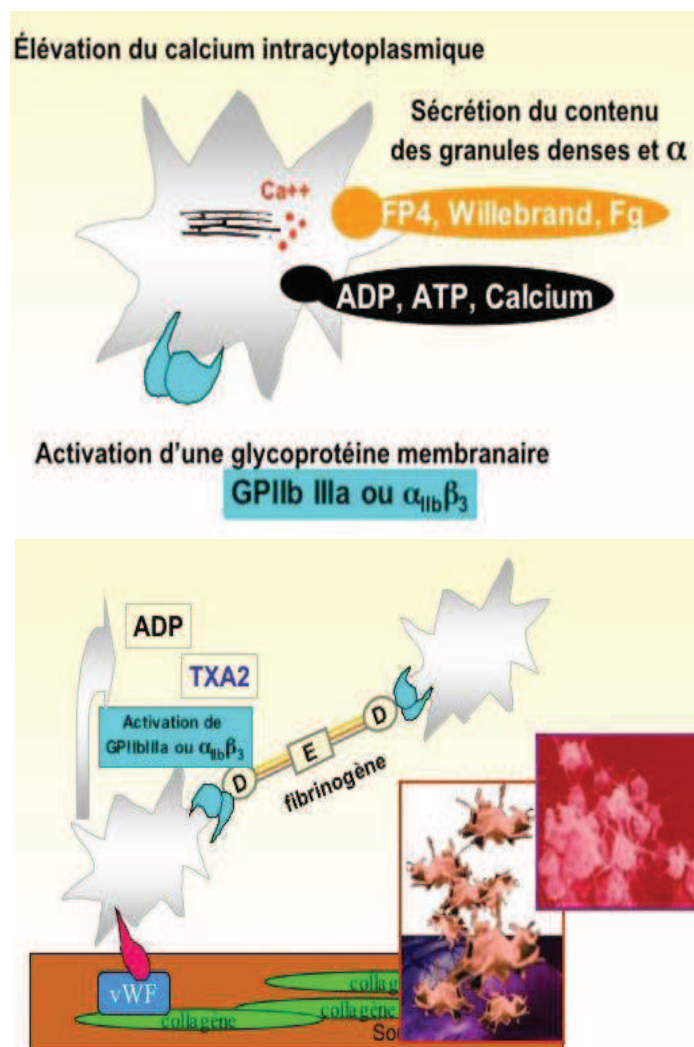
## c. L'activation plaquettaire

Initialement discoïdes, les plaquettes vont devenir sphériques et volumineuses par l'absorption d'eau, puis s'étalent et émettent des pseudopodes, et expriment à la surface de leur membrane un certain nombre de protéines (GPIIb IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3) et GMP140).

L'agrégation des plaquettes est définie comme la propriété des plaquettes à adhérer les unes aux autres, sous l'effet d'un stimulus pour former des agrégats cellulaires. De nombreuses substances sont capables *in vitro* et probablement *in vivo* d'induire une agrégation plaquettaire: ADP, collagène, thrombine adrénaline, sérotonine, acide arachidonique, thromboxane A<sub>2</sub>, trypsine, complexes immuns, et le Platelet Activating Factor (PAF).

L'agrégation plaquettaire nécessite la présence de fibrinogène et du complexe GPIIb-IIIa stabilisé par le Ca<sup>++</sup> : en effet, après activation plaquettaire, le complexe GPIIb-IIIa est modifié structuralement ce qui le rend capable de fixer le fibrinogène circulant et permet

l'agrégation des plaquettes entre elles. C'est un phénomène actif nécessitant de l'énergie fournie par l'ATP et l'ADP intragranulaires. A ce stade, l'agrégation est encore un phénomène réversible car le fibrinogène peut encore se détacher de son récepteur et libérer les plaquettes dans la circulation. Puis les plaquettes produisent le thromboxane A2 et libèrent le contenu de leurs granules, ce qui amplifie le phénomène d'agrégation plaquettaire et le rend irréversible. Entre autres, la modification de la concentration intracytoplasmique de  $Ca^{++}$  permet le changement de conformation du complexe GPIIb-IIIa et sa liaison au fibrinogène. La sécrétion de protéines adhésives (thrombospondine, vWF, et fibronectine) assure l'irréversibilité de l'agrégation et la consolidation du « clou plaquettaire » ainsi formé. (Figure 6).



**Figure 6** : Activation et agrégation plaquettaire (d'après M. Vasse, 2007)

## **II.2 Les protéines de la coagulation**

### **II.2.1 Les facteurs de la coagulation**

Les facteurs de coagulation répertoriés dans le tableau 1 ont été désignés par un numéro en chiffre romain par un comité international de standardisation en 1954 (Boneu et al. 1997). Une fois ces facteurs activés, le numéro en chiffre romain est accompagné d'un suffixe « a ». Sur le plan fonctionnel, les facteurs de la coagulation se répartissent en trois groupes :

#### *Les zymogènes :*

Ces facteurs sont présents sous forme de précurseurs inactifs (zymogène) dont l'activation correspond à une protéolyse limitée et spécifique de la protéine qui devient une enzyme. Les facteurs II, VII, IX, X, XI ainsi que la prékallikréine sont des zymogènes de sérine protéase dont le site catalytique, masqué tant que la protéine n'est pas activée, est situé au niveau de la partie carboxy-terminale de la molécule. Le FXIII (tétramère  $\alpha_2\beta_2$ ) est le zymogène d'une transglutaminase dont le site catalytique est situé sur les deux sous-unités  $\alpha$ . De plus, les FII, FVII, FIX, et FX sont des protéines vitamines K-dépendantes. La vitamine K est le cofacteur d'une enzyme, la carboxylase, qui convertit des résidus d'acide glutamique en acide  $\gamma$ -carboxyglutamique dans la région amino-terminale de ces protéines. Les résidus Gla sont indispensables à l'activité de ces protéines. Ils permettent leur liaison au niveau des phospholipides anioniques en présence de calcium. La protéine C (PC) et la PS sont également des protéines vitamine K-dépendantes.

Attachés au domaine Gla, la prothrombine (FII) porte deux domaines « kringles » (K1 et K2) alors que les FVII, FIX et FX portent deux domaines « epidermal growth factor » (EGF). Ces domaines permettent d'établir des interactions entre les différentes protéines de la coagulation de manière à former des complexes.

Les FXI, FXII ainsi que la prékallikréine ne sont pas vitamine K-dépendants. Ils portent néanmoins au niveau de la région N-terminale des domaines leur permettant de se lier aux surfaces phospholipidiques ainsi qu'aux protéines de la coagulation.

#### *Les cofacteurs :*

Les facteurs **V**, **VIII**, et le kininogène de haut poids moléculaire (**KHPM**) sont des cofacteurs enzymatiques et non des zymogènes. Les facteurs V et VIII sont des glycoprotéines de grande taille de structure très proche. Ils comportent trois domaines A et deux domaines C, 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 sensible 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. Ces fragments sont générés par excision d'une partie de la région centrale. Le KHPM est une protéine monocatanaire 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 le FV et le 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 (le facteur tissulaire (FT), le FVa et le FVIIIa) (Butenas et Mann 2002).

#### *Le substrat de la thrombine*

Le fibrinogène est le précurseur de la fibrine. Il interviendra dans l'hémostase primaire mais aussi dans la coagulation. Cette molécule est un dimère. Chaque monomère est composé de trois chaînes (alpha, bêta, gamma). La molécule du fibrinogène comporte un domaine central E et deux domaines latéraux D.

**Tableau 1:** Les protéines plasmatiques de la coagulation et leurs principaux inhibiteurs.

<b>Facteurs de coagulation</b>	<b>Nom</b>	<b>PM (Da)</b>	<b>Fonction</b>	<b>Concentration (µg/mL)</b>	<b>Lieu de synthèse</b>
<b>Facteur I</b>	Fibrinogène	333000	Substrat	200/400	Foie
<b>Facteur II</b>	Prothrombine	72000	Zymogène	100	Foie
<b>Facteur V</b>	Proaccéléline	330000	Procofacteur	10	Foie
<b>Facteur VII</b>	Proconvertine	51000	Zymogène	0.5	Foie
<b>Facteur VIII</b>	Anti-Hémoph A	330000	Procofacteur	0.1	Foie
<b>Facteur IX</b>	Anti-hémoph B	55000	Zymogène	5	Foie
<b>Facteur X</b>	Stuart	59000	Zymogène	10	Foie
<b>Facteur XI</b>	Rosenthal	160000	Zymogène	5	Foie
<b>Facteur XII</b>	Hageman	80000	Zymogène	30	Foie
<b>Facteur XIII</b>	Stabilisant fibrine	300000	Zymogène	20	Foie
<b>FT</b>	Facteur tissulaire	37000	Cofacteur	0	Divers types cellulaires (CE, CML...)
<b>PC</b>	Protéine C	62000	Zymogène	5	Foie
<b>PS</b>	Protéine S	80000	Cofacteur	25	Foie
<b>TM</b>	Thrombomoduline	60300	Cofacteur	0	CE et CML
<b>AT</b>	Antithrombine	58200	Inhibiteur	150	Foie
<b>EPCR</b>	Récepteur endothélial de la protéine C	46000	Inhibiteur	100	Surface des CE, CML
<b>TFPI</b>	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire	42000	Inhibiteur	5-20	CE, CML, hépatocytes
<b>vWF</b>	Facteur Von Willebrand	270000	Cofacteur	10	CE, mégacaryocytes



## II.2.2 Eléments cellulaires

La coagulation ne peut se dérouler sans la présence de surfaces anioniques fournies par les cellules (notamment les CE, les monocytes et les plaquettes) ou de certains de leurs constituants. Les *CE* et les *monocytes*, après stimulation par certaines cytokines ou des facteurs physico-chimiques, peuvent exprimer à leur surface le FT qui est l'élément déclenchant majeur de la voie extrinsèque de la coagulation.

Lorsque les *plaquettes* sont activées, les phospholipides anioniques membranaires (notamment la phosphatidylsérine) sont externalisés et servent de surface de catalyse aux réactions de coagulation. Les plaquettes (tout comme les monocytes) peuvent aussi libérer dans le milieu plasmatique de petits fragments de membrane appelés microvésicules capables elles aussi de supporter le phénomène de coagulation et donc de l'amplifier.

Enfin, les *fibroblastes* sont également capables d'exprimer le FT et de synthétiser tout comme les cellules musculaires de nombreux facteurs impliqués dans la 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 7 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 7 B) ».

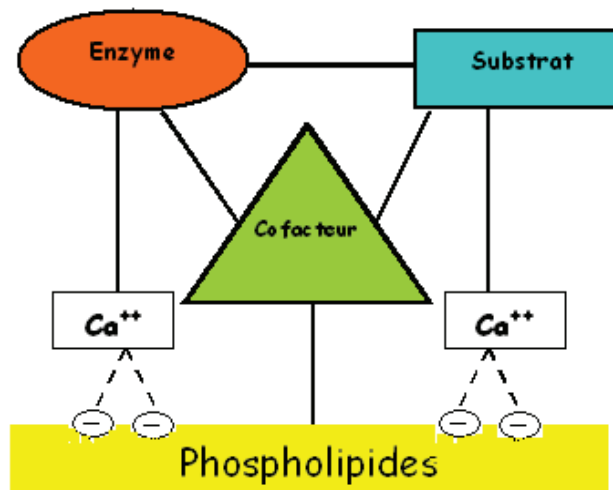


Figure A

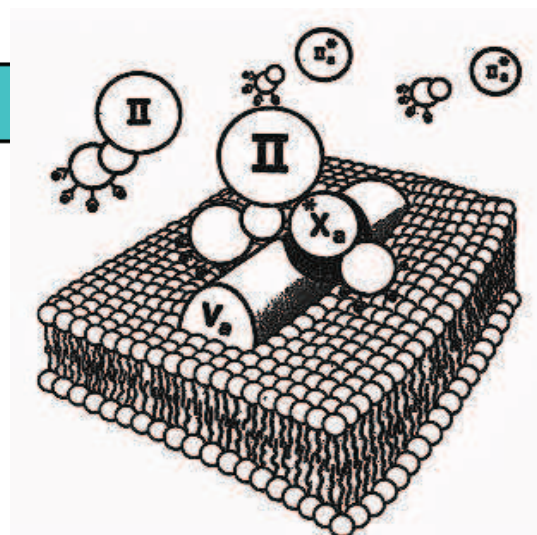


Figure B

**Figure 7 :** Rôle des surfaces phospholipidiques dans les réactions enzymatiques de la coagulation. **A)** Principe des réactions enzymatiques de la coagulation sur les surfaces phospholipidiques. **B)** la coagulation est un phénomène de surface, exemple du «complexe prothrombinase».

### **II.2.3. Les inhibiteurs de la coagulation**

La coagulation est un système soumis à une régulation permettant un maintien de la fluidité du sang. Il est très important pour l'organisme que les enzymes formés lors de l'activation de la coagulation (thrombine, FXa) ne circulent pas dans le plasma car ils risqueraient d'entraîner une activation diffuse de la coagulation et un processus pathologique grave. Pour éviter ceci et maintenir la balance hémostatique, chaque facteur activé a son inhibiteur. Il existe trois systèmes inhibiteurs principaux : l'AT, le système PC, PS, et le TFPI.

- *l'antithrombine (AT)* est une serpine qui inhibe principalement la thrombine mais aussi le FXa, le FIXa et partiellement le FXIa. Son activité anticoagulante est augmentée de façon très importante par l'héparine (utilisé en thérapeutique) (Miletich JP et al. 1978). Les déficits en AT sont des maladies graves responsables de thromboses à répétition (thromboses veineuses, embolies pulmonaires). Il existe un autre inhibiteur de la thrombine dont l'importance physiologique est peu connue et probablement minime : le second cofacteur de l'héparine.

- *le système Protéine C-Protéine S* : La PC circule sous forme inactive. Elle peut être activée par la thrombine en PCa à condition que la thrombine soit fixée sur un récepteur appelé la TM. La PCa est un inhibiteur très puissant des facteurs Va et VIIIa. Son action est augmentée par une autre substance circulant dans le sang, la PS. Il existe des déficits en PC et PS exposant les sujets atteints à un risque de thrombose.

Dans les substrats de la PCa, le plus important paraît être le FVa. Certains individus présentent une anomalie du FV qui rend le FVa insensible à l'action neutralisante de la PCa, souvent appelée résistance à la PCa (RPCA). Cette anomalie moléculaire se situe sur le gène du FV et est appelée FV Leiden (ou mutation R506Q). Les sujets porteurs de cette mutation ont un risque augmenté de thromboses veineuses.

- *la thrombomoduline* : c'est une protéine transmembranaire exprimée par les CE et les CML. Elle fixe la thrombine, ce qui bloque ses interactions avec les autres protéines et modifie ainsi sa spécificité enzymatique (Esmon 1989 ; Dahlback et Villoutreix 2005 ; Ye et al. 1992) : la thrombine perd alors son activité procoagulante devenant incapable de coaguler le fibrinogène, d'activer les FV (Esmon et al. 1982) et FVIII ainsi que les plaquettes (Esmon et al. 1983) et acquiert des propriétés anticoagulantes en activant la PC en PCa (Esmon 2003 ; Weiler et Isermann 2003 ; Dahlback et Villoutreix 2005). La thrombine seule est capable d'activer la PC, cependant sa vitesse d'activation est environ 1000 fois plus importante en présence de TM (Perera 2000). De plus, la liaison de la thrombine à la TM induit une inhibition plus efficace de la thrombine par l'AT. L'accélération de l'inactivation de la

thrombine (la demi vie de la thrombine est d'environ 3 secondes) est complètement dépendante de la présence de chaînes de chondroïtine sulfate sur la TM (Esmon et al. 1999).

- *le TFPI* : c'est une protéine anticoagulante endogène, inhibitrice de protéase. Il est le seul régulateur connu de la voie dépendante du FT de la coagulation sanguine. Il est connu pour jouer un rôle important dans le contrôle de la thrombogenèse à la fois cellulaire et plasmatique.

Le TFPI agit au niveau la phase d'initiation, il se lie au FXa puis forme un complexe quaternaire FT/FVIIa/FXa/TFPI. Le complexe FT/FVIIa est alors inhibé ce qui bloque la synthèse des FXa et FIXa et donc celle de la thrombine (Baugh et al. 1998 ; Broze et al. 1990). Les complexes FT/FVIIa ne peuvent être inhibés qu'après avoir initié la formation de FXa (Lwaleed et Bass 2006).

### **II.3. Hémostase secondaire (coagulation sanguine)**

La coagulation est une cascade de réactions enzymatiques ordonnées aboutissant à la formation de fibrine.

L'enzyme centrale permettant de transformer le fibrinogène en fibrine est la thrombine. Le processus de formation de la thrombine est complexe avec une série d'activations enzymatiques.

*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 prépondérante 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.

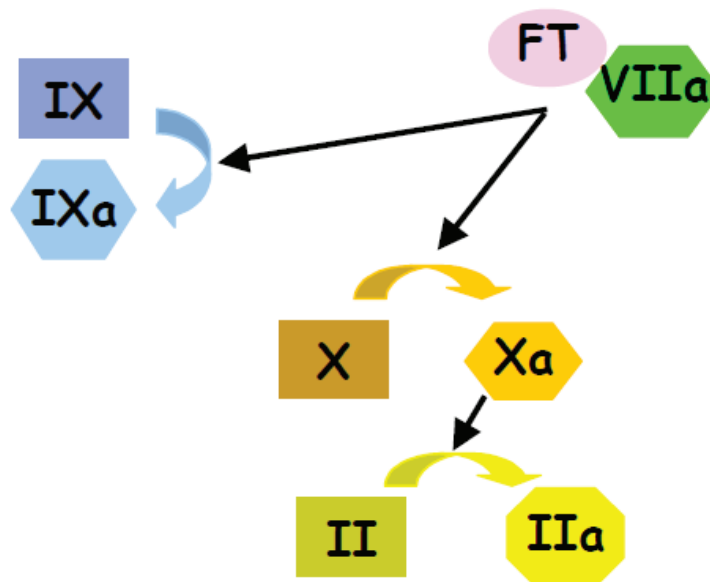
Le déroulement de la coagulation *in vivo* ne respecte pas cette distinction voie intrinsèque – voie extrinsèque. Cette conception duale de la coagulation correspond en fait aux processus de coagulation *in vitro* et est très utilisée pour l'exploration de la coagulation en biologie chimique car la voie intrinsèque (ou endogène) et la voie extrinsèque (ou exogène) sont respectivement explorées par le temps de céphaline activée et le temps de Quick. C'est donc sur ce schéma que pourra se faire le raisonnement diagnostique d'interprétation des tests de coagulation bien que ce schéma ne corresponde sans doute pas à la réalité *in vivo*.

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

### II.3.1. Initiation

Dans un vaisseau sain, le FT n'est pas disponible dans la circulation, c'est une protéine membranaire présente dans la tunique externe du vaisseau, qui est exprimée au niveau du site de la lésion vasculaire lors de la rupture d'un vaisseau. L'interaction entre le FVIIa, qui représente dans le milieu plasmatique 1 à 2 % de la concentration en FVII total (Morrissey et al. 1993), et le FT est l'élément déclenchant de la coagulation. La source de FVIIa est controversée. Il a été rapporté qu'il serait issu des cellules sanguines tels les leucocytes, les monocytes ou encore des microvésicules plaquettaires ou bien qu'il circulerait comme une protéine soluble [Butenas et al. 2005; Giesen et al. 1999; Osterud 2001]. Le FVIIa non lié au FT n'a pas d'activité protéolytique pour les FIX et FX (Komiyama 1990) par masquage du site actif, ce qui lui permet aussi d'échapper aux inhibiteurs contenus dans le plasma. Le FVII est converti par protéolyse limitée en FVIIa par de nombreuses enzymes dont la thrombine, le FXa, le FIXa et le FXIIa.

Le FVIIa active également le FVII en présence de FT (Nakagaki et al. 1991). Le complexe FT/FVIIa active les FIX et FX fixés sur la surface membranaire avec une efficacité plus importante pour le FX (Lawson et Mann 1991). Le FXa active à son tour la prothrombine à la surface des plaquettes activées ce qui permet la formation des premières molécules de thrombine (Figure 8).



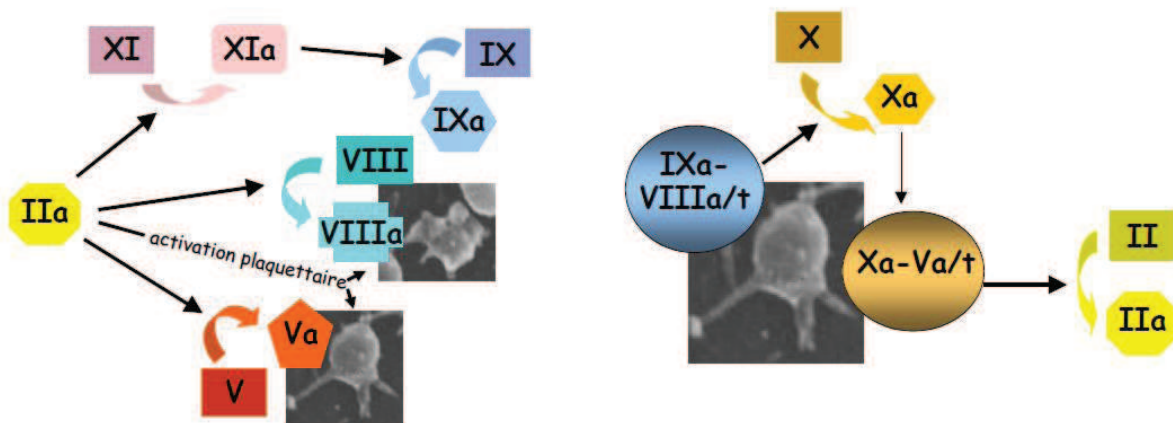
**Figure 8** : Phase d'initiation de la coagulation (d'après Lecompte et al. 2006).

### II.3.2. Amplification et propagation du système

La thrombine amplifie alors immédiatement sa propre formation :

- (1) elle stimule l'activation des plaquettes augmentant ainsi la quantité de phospholipides membranaires nécessaires à la réaction en se fixant sur son récepteur PAR1 et en le clivant.
- (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-Ca<sup>2+</sup>-phospholipides) et prothrombinase (FXa-FVa-Ca<sup>2+</sup>-phospholipides).
- (3) elle peut aussi activer lentement le FXI qui active le FIX (Figure 9).

La thrombine peut également activer d'autres cellules que les plaquettes, principalement les leucocytes et les cellules vasculaires qui contribuent aux mécanismes de réactions inflammatoires, de remodelage du vaisseau ainsi qu'à la cicatrisation.



**Figure 9** : Phases d'amplification et de propagation de la coagulation (d'après Lecompte et al. 2006).

Lorsque la concentration en 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. Les monomères de fibrine obtenus permettent de former un gel constitué de longs polymères. Il y a alors formation du caillot par accumulation de fibrine au niveau de l'agrégat plaquettaire. 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.

## II.4. Régulation

La coagulation est un système soumis à une régulation. Les réactions de coagulation sont limitées au niveau de la brèche vasculaire grâce à des systèmes de contrôle. Des inhibiteurs stoechiométriques circulant dans le plasma et qui neutralisent directement l'activité de protéases impliquées dans la coagulation (Figure 10).

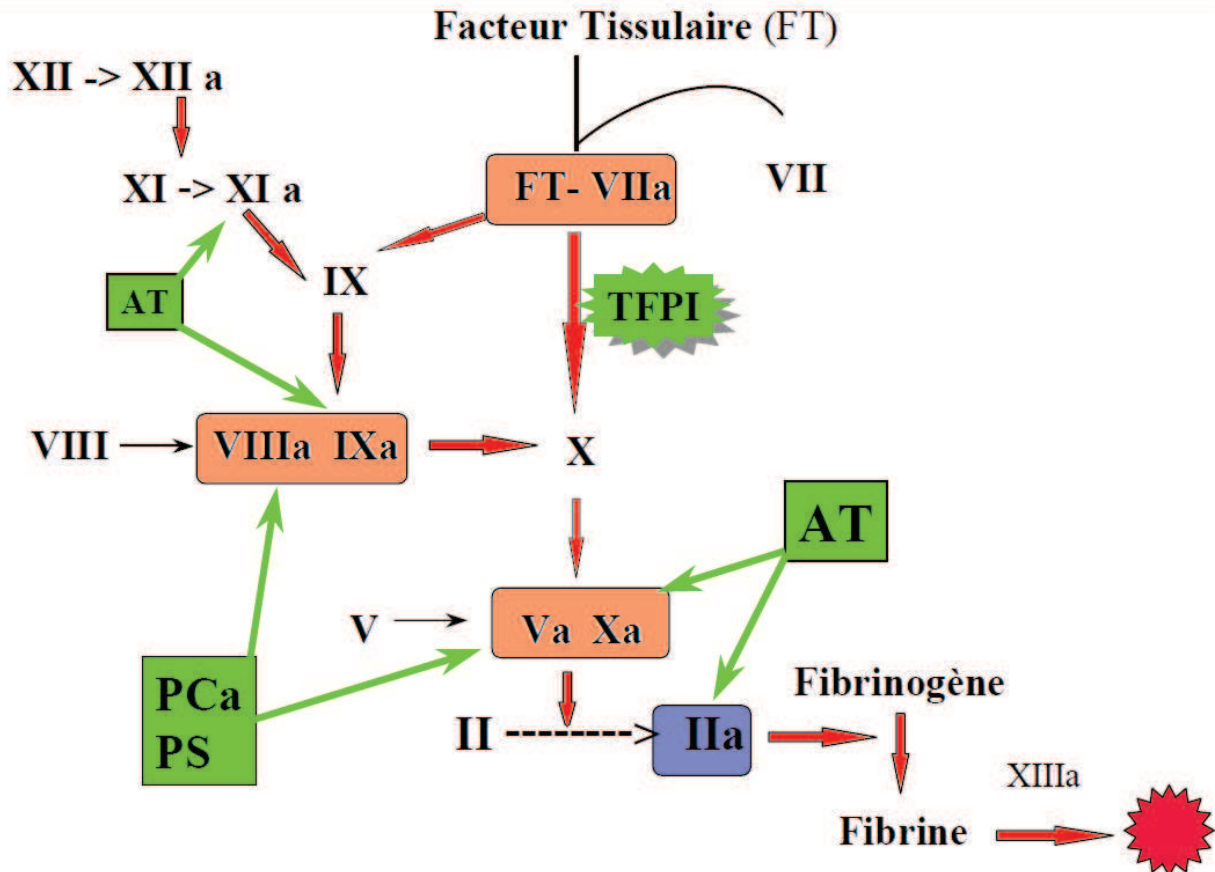


Figure 10 : Les inhibiteurs de la coagulation

## II.5. Lieu de synthèse des différents facteurs (Tableau 1)

La plupart des facteurs de coagulations, tels que le FI, FII, FV, FVII, FVIII et FX sont synthétisés au niveau du foie. D'autres facteurs sont synthétisés au niveau d'autres types cellulaires. C'est le cas en particulier du TFPI qui est produit principalement par la CE mais également par les hépatocytes, les CML (Caplice et al. 1998 ; Lwaleed et Bass 2006) et présent à de faibles concentrations dans le sang (Novotny et al. 1991).

## **II.6. L'hémostase chez le rat**

Les facteurs de coagulation murins et leur fonction sont assez similaires aux facteurs de coagulations humains (Tableau 2).

Les chaînes de fibrinogène murin sont identiques à 70-90% au fibrinogène humain. Cependant, une séquence peptidique arginine-glycine-acide aspartique (RGD) au niveau domaine C du fibrinogène murin, se trouve absente dans le fibrinogène humain. La formation des fibrilles de fibrine à partir du fibrinogène humain et murin, par le FXIIIa, est similaire (Jirouskova et al. 2001) ainsi que les interactions entre plaquettes et intégrines  $\alpha_{IIb}\beta_3$  et  $\alpha_M\beta_2$  (Flick et al. 2004) *in vivo*. Cependant, le caillot de fibrine murin reste relativement plus résistant à la lyse par le plasminogène murin (Lijnen et al. 1994)

Des études ont également montré que la séquence ADNc et peptidique de la prothrombine murine est très proche de l'humaine, avec une similitude de 81%. De même pour sa concentration plasmatique qui se trouve être similaire à celle de la prothrombine humaine (70 -140  $\mu\text{g/mL}$ ) (Emeis et al. 2007).

D'autre part, le gène de l'AT murin code pour une protéine avec une séquence peptique identique à 89% à la séquence de l'AT humaine. Quant à sa concentration plasmatique, elle est aussi assez comparable à celle retrouvée chez l'homme (environ 2  $\mu\text{M}$ ).

De plus, la comparaison des séquences géniques codantes pour les facteurs de coagulation FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXIII murins et humains, a montré des séquences identiques à environ 70% (Emeis et al. 2007).

Il en est de même pour les systèmes inhibiteurs avec une plus forte similitude entre la PS et TFPI humain et murin. Ce dernier présente, cependant, deux formes de TFPI,  $\alpha$  et  $\beta$ , issus d'un épissage alternatif (Chang et al. 1999). Le TFPI $\alpha$  est fortement exprimé dans le placenta murin et le second se trouve être restreint aux tissus (Pederson et al. 2005 ; Chang et al. 1999)

**Tableau II :** Concentration et poids moléculaire des principaux facteurs de coagulation murins et leurs inhibiteurs (d'après Emeis et al. 2007)

<b>Facteur</b>	<b>PM</b>	<b>Concentration dans le plasma</b>	<b>Modèle de déficience</b>
Fibrinogène chaîne $\alpha$	61000	2 mg/ml	Hémorragie spontanée
Fibrinogène chaîne $\beta$	55000	-	-
Fibrinogène chaîne $\gamma$	50000	-	-
Prothrombine	70000	100 $\mu$ g/ml	Hémorragie spontanée et mort embryonnaire
Facteur Tissulaire	33000	-	Hémorragie spontanée et mort embryonnaire
L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire	35000	1-5 $\mu$ g/ml	Hémorragie spontanée et mort embryonnaire
Facteur V	300000	4,6 $\mu$ g/ml	Hémorragie spontanée et 50% de mort embryonnaire
Facteur VII	50000	-	Hémorragie spontanée
Facteur VIII	270000	1 $\mu$ g/ml	Hémorragie spontanée
Facteur IX	52000	-	Hémorragie occasionnelle
Facteur X	54000	-	Hémorragie spontanée et mort embryonnaire
Facteur XIII	83000	-	Hémorragie spontanée
Facteur von Willebrand	>300000	-	Hémorragie occasionnelle
Thrombomoduline	62000	-	Mort embryonnaire et thrombose spontanée
Protéine C	52000	12 $\mu$ mol/L	Thrombose spontanée
Protéine S	75000	-	-
Récepteur endothélial de la Protéine C	27000	-	Mort embryonnaire et thrombose spontanée
Antithrombine	52000	105 $\mu$ g/ml	Mort embryonnaire et thrombose spontanée

Cependant, malgré toutes ces similitudes structurales, des études ont montré qu'une dose 100 fois plus élevée de thrombine est nécessaire pour provoquer une diminution du temps de



coagulation chez le rat par rapport à l'homme. D'autre part, les plaquettes du rat sont 4 fois moins sensibles à la thrombine que les plaquettes humaines Derian et al 1995 ; Sidhu et al. 1979).

En outre, les effets des médicaments anticoagulants et antiplaquettaires sont différents chez les rats et les humains. Une dose 40 fois plus élevée de l'inhibiteur puissant du facteur Xa, DX-9065, est nécessaire pour inhiber la formation de thrombus chez le rat par rapport à l'homme (Hara et al. 1995). Dans une autre étude, le métabolite actif du prasugrel inhibe l'agrégation plaquettaire avec un IC50 3 fois plus élevé pour les rats par rapport à l'homme (Niitsu et al. 2005)

D'après Gentry et al, les processus biochimiques de la génération de thrombine et la formation de fibrine restent, cependant, similaires entre les espèces (Gentry 2003).

### **III. Pathologie liée au vaisseau - vieillissement artériel**

Le développement de la rigidité des gros troncs artériels, manifestation principale du vieillissement artériel, est considéré comme un facteur de risque indépendant de morbidité et de mortalité (Laurent et coll. 2001; Safar et coll. 2003).

L'hypertension systolo-diastolique a toujours été considérée comme un accélérateur du vieillissement artériel (Safar et Benetos 2003; Safar et coll. 2003). Dans une étude longitudinale, Benetos et coll. ont démontré que l'évolution de la rigidité artérielle avec l'âge était 2 fois plus importante chez des sujets hypertendus que chez des sujets normotendus (Benetos et coll. 2002). Ces résultats démontrent qu'à long terme, l'hypertension systolo-diastolique est un accélérateur du vieillissement artériel et de la rigidité des gros troncs artériels.

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

Ainsi, dans la survenue d'une thrombose coronaire, 3 processus sont observables: 1) une diminution ou une perturbation du flux sanguin : la sténose coronaire ; 2) une lésion de la paroi du vaisseau : la plaque instable ; 3) une perturbation de l'équilibre hémostatique du

sang: la thrombogénicité. Dans les « syndromes coronaires aigus » (SCA), la rupture ou l'érosion de la plaque mettent en contact le sang circulant avec les éléments thrombogènes de la MEC, provoquant la génération de traces de thrombine, l'activation des plaquettes et la coagulation menant à la formation du thrombus.

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

### **III.1. La rigidité artérielle**

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

La média, de par sa composition, est une tunique importante dans la détermination de l'élasticité pariétale artérielle globale (Nichols et O'Rourke 1998). Ses éléments constitutifs sont caractérisés chacun par un module élastique différent : il existe ainsi des éléments à faible module élastique (élastine, CML) et des éléments à fort module élastique (collagène). Le module élastique du collagène est 10 à 30 fois supérieur à celui de l'élastine et des CML (Burton 1954).

Au sein de la média, la répartition et la quantification de ces différents éléments peuvent être étudiées histologiquement en deux (histomorphométrie, (Corman et coll. 1998) ou trois dimensions (microscopie confocale, (McGrath et coll. 1995). Les taux de collagène et d'élastine peuvent être également mesurés *via* le dosage de l'un de leurs acides aminés modifiés caractéristiques, respectivement hydroxyproline (Neuman et Logan 1950; Cantini et coll. 2001) et desmosine et isodesmosine (Giummelly et coll. 1999).

### *Elastine et collagène*

La composition relative en collagène et en élastine dans la média aortique est maintenue stable grâce à un processus lent mais dynamique de production et de dégradation par les CML vasculaires.

L'élastine est une protéine élastomérique très extensible, vectrice des propriétés de distensibilité des gros troncs artériels. Dans la média, l'élastine est organisée en un réseau de lames élastiques continues, parallèles et concentriques (Wolinsky et Glagov, 1967).

Le rôle physiologique des fibres de collagène est de maintenir l'intégrité de la structure vasculaire en résistant aux forces de traction des parois vasculaires (contraintes longitudinale, radiale et circonférentielle). En effet, les fibres de collagène sont très peu extensibles mais leur organisation en réseau les rend toutefois flexibles (Roveri et coll. 1978). De plus, les molécules de collagène sont immédiatement liées, pontées entre elles après leur formation afin de les rendre résistantes aux enzymes hydrolytiques. Les modifications des molécules de collagène ou de leurs liaisons induisent des pertes graves de la cohésion du tissu conjonctif pariétal.

### *Cellules musculaires lisses vasculaires*

Les CML médiales jouent un rôle essentiel dans l'équilibre du processus de production et de dégradation de la MEC, puisqu'elles synthétisent aussi bien l'élastine et le collagène que les métalloprotéases matricielles (MMP), collagénases et élastases, qui catabolisent ces mêmes protéines. De plus, des études ont montré que la perte de la propriété élastique de la paroi artérielle peut résulter, entre autres, de changements dans les propriétés structurelles des CML (Qiu et al. 2010). Qiu et al. ont observé que la rigidité des CML, mesurée à la fois par microscopie à force atomique et dans un modèle de tissu reconstitué, est significativement augmentée dans l'aorte dans un modèle de singe âgé par rapport au jeune, en association avec l'expression accrue de l'actine du muscle lisse (SMA pour *Smooth muscle Actin*) et de l'intégrine  $\beta 1$ . La rigidité des CML a été fortement réduite après le désassemblage du cytosquelette d'actine ou l'inhibition de la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK). Ces données suggèrent que l'augmentation de la rigidité vasculaire au cours du vieillissement est au moins en partie attribuable à des changements dans les CML intrinsèques. Cependant, l'utilisation de conditions de culture *in vitro* peuvent modifier profondément l'expression génique et ainsi influencer le phénotype de la cellule. Le traitement de la rigidité des gros troncs artériels chez les patients en utilisant les inhibiteurs calciques et les antagonistes des

récepteurs de l'angiotensine II réduit la rigidité artérielle dans hypertension (Mahmud et Feely 2002 ; Ishimitsu et al. 2009 ; Andreadis et al. 2010).

Il a été montré précédemment que l'inactivation des composantes du cytosquelette seul ou de l'adhésion focale des CML telle que la desmine ou intégrine  $\alpha 1$  modifie la rigidité artérielle (Lacolley et al. 2001 ; Louis et al. 2007). Plus intéressant, l'inactivation ciblée de *Srf* dans les lignées de muscles squelettiques au cours du développement entraîne une absence de production de mésoderme chez les souris KO, suivie d'une létalité périnatale (Arsenian et al. 1998). SRF est donc nécessaire à la mise en place du sarcomère et à la maturation de la fibre musculaire squelettique. Cependant, une telle inactivation des gènes du cytosquelette au cours de l'embryogenèse est souvent partiellement compensée par l'augmentation d'autres composants du cytosquelette.

#### *MEC et interactions cellules-matrices*

Entre les fibres élastiques, se trouve la matrice interstitielle, composée de collagènes fibrillaires (majoritairement de type III), de glycoprotéines de structure (fibronectine, laminine) et de protéoglycanes (Robert 1987).

Les glycoprotéines de structure sont des protéines d'adhérence, responsables des interactions entre la membrane cellulaire et les autres composants de la MEC (Yamada et coll. 1983). Ainsi, les liaisons entre les CML et la MEC impliquent des protéines d'adhésion du type fibronectine et leurs récepteurs membranaires, les intégrines, et constituent de véritables structures d'attachement nommées plaques denses (Gabella, 1984; Bezie et coll., 1998a; Lacolley et coll. 2002).

Les branchements latéraux entre les fibres élastiques et la surface cellulaire permettent de cette façon de coupler chaque feuillet élastique au suivant. Les connections ainsi organisées coordonnent la tension des lames élastiques à la tension des cellules CML (Gabella, 1984).

Le nombre d'attachements entre cellules et MEC pourrait influencer directement les propriétés mécaniques de la paroi en limitant la capacité de celle-ci à se déformer sous l'effet d'une contrainte. Bezie et ses collaborateurs ont mis en évidence une augmentation du nombre de liaisons cellules-matrice chez le rat spontanément hypertendu (SHR) par rapport au rat contrôle (Bezie et coll. 1998b). Ces auteurs suggèrent qu'il s'agirait d'un phénomène d'adaptation à l'hypertension pour maintenir un comportement mécanique des parois artérielles identique entre le rat hypertendu et normotendu en conditions isobariques (Bezie et coll. 1998a). En revanche, chez le rat SHR âgé, l'augmentation de la rigidité pariétale artérielle liée à l'âge pourrait être due à une augmentation des liaisons cellules matrice : le

vieillesse prendrait le pas sur le phénomène adaptatif et le nombre accru de liaisons cellules-matrice participerait à la rigidification de la paroi (Marque et coll. 1999). Il serait également possible qu'une augmentation du nombre de liaisons cellules-matrice influence l'augmentation de la rigidité pariétale artérielle avec l'âge chez le sujet normotendu mais cela doit encore être vérifié (Lacolley 2007).

### **III.2. La coagulation dans l'hypertension**

Bien que divers études cliniques et expérimentales tendent à montrer une altération de l'équilibre hémostatique dans le sang causé par des changements au niveau des facteurs individuels de coagulation, en présence d'une pression artérielle élevée il est encore difficile de savoir si l'hypertension, elle-même, confère un état prothrombotique dans le sang et dans la paroi vasculaire. À l'appui d'un état d'hypercoagulabilité, quelques études cliniques ont montré des concentrations plasmatiques plus élevées de FVII, de fibrinogène et des D-dimères de fibrine chez les patients hypertendus par rapport aux sujets normotendus (Arikan et Sen 2005 ; Junker et al. 1998 ; Lip et Li-Saw-Hee 1998). Cependant, une augmentation des quantités en AT et PC suggèrent plutôt le contraire, à savoir que l'hypertension peut promouvoir des systèmes anticoagulants. Chez différents modèles animaux d'hypertension spontanée ou induite tels que le rat spontanément hypertendu (SHR) et le rat avec une hypertension induite au deoxycorticostéron acétate, un état d'hypercoagulabilité a été démontrée par des niveaux élevés de complexe thrombine-antithrombine (TAT) ainsi que des D-dimères de fibrine. Ceci est appuyé par une augmentation des concentrations en FT (Corseaux et al. 2002) et une diminution de celle en TM (Sawada et al. 2003). Une augmentation de la concentration plasmatique en fibrinogène et prothrombine a également été montrée chez le SHR, ce qui tend à promouvoir une coagulation accrue malgré l'augmentation de la quantité d'AT (Gomibuchi et al. 2007). Chez le rat spontanément hypertendu stroke prone (SHRSP), la réduction de l'activité du FXa et du temps de prothrombine peuvent expliquer une atténuation de l'activation de la coagulation sanguine (Abumiya et al. 2000). Dans les modèles expérimentaux d'hypertension artérielle, la contribution directe des cellules vasculaires de la coagulation n'a pas été bien documentée. Des travaux précédents ont montré principalement une augmentation de l'expression vasculaire de TF et des molécules anti-fibrinolytiques (Corseaux et al. 2002).

**Tableau III** : La balance hémostatique dans des modèles d'hypertension.

<b>Modèle</b>	<b>Facteur procoagulant</b>	<b>Facteur anticoagulant</b>
<b>Clinique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation en FVII</li> <li>• Augmentation en Fibrinogène</li> <li>• Augmentation en D-Dimères de fibrine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation en AT</li> <li>• Augmentation en PC</li> </ul>
<b>SHR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation en prothrombine</li> <li>• Augmentation en Fibrinogène</li> <li>• Augmentation en TAT</li> <li>• Augmentation en D-Dimères de fibrine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation en AT</li> <li>• Diminution en TM</li> </ul>
<b>SHR-SP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réduction de l'activité FXa</li> <li>• Réduction du temps de prothrombine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation en inhibiteur C1</li> </ul>
<b>Modèles à hypertension induite</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation en FT</li> <li>• Augmentation en TAT</li> <li>• Augmentation en D-Dimères de fibrine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminution en TM avec l'âge</li> </ul>

### **III.3. Implication des CML dans la cascade de coagulation**

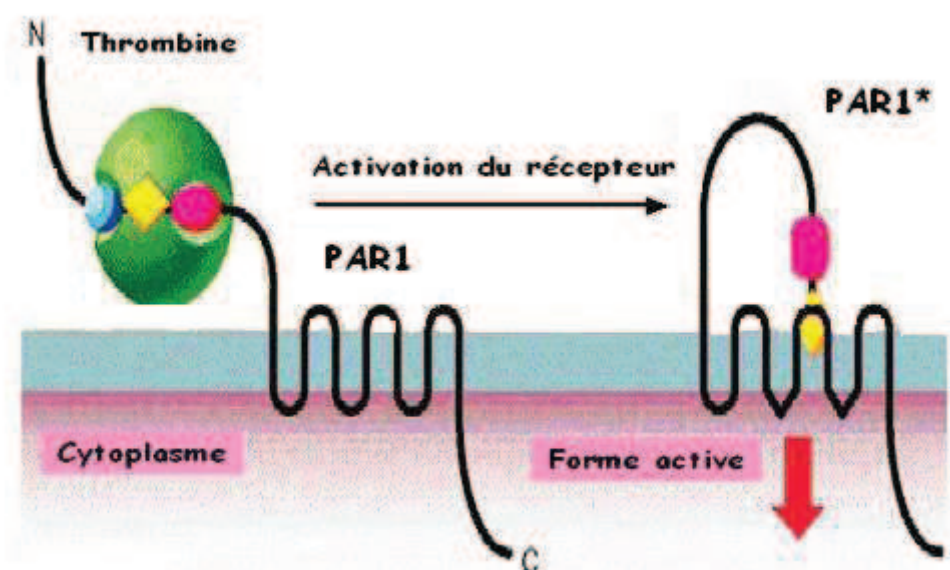
Longtemps, il a été considéré que la génération de thrombine ne peut se faire qu'en présence des plaquettes comme source de surfaces cellulaires ainsi que de certains facteurs de coagulation. Cependant, plusieurs études se sont intéressées à la génération de thrombine par les cellules vasculaires qui exposent des surfaces phospholipidiques et qui sont capables de synthétiser certains facteurs pro- et anticoagulants.

Divers études ont montré que les CML pouvaient, en effet, synthétiser, de façon constitutive aussi bien qu'après stimulation, des facteurs pro-coagulants tel que le FT et / ou anticoagulants tels que le TFPI, la TM et l'EPCR. Parmi les agents qui peuvent moduler cette synthèse, on retrouve les facteurs de croissance (PDGF « pour platelet-derived growth factor », FGF « pour Fibroblast growth factor », sérum...etc), des agents mitogènes (thrombine, angiotensine II) et des cytokines inflammatoires (IL1, TNF- $\alpha$ ) qui permettent la mobilisation du calcium intracellulaire (Taubman et al. 1993 ; Caplice et al. 1998 ; Soff et al. 1991 ; Bretschneider et al. 2007). D'autres études ont rapporté que les CML peuvent même exprimer

certaines facteurs de coagulation comme la prothrombine (McBane et al. 1997) et le FV (Rodgers 1988). Flynn et al (Flynn et al. 1997) 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 d'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 (Pathak et al. 2006) 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-FV et que le pic de génération de thrombine (dans un plasma dépourvu en plaquettes) à la surface des CML aortiques humaines en présence de FV à 0,6 pM est diminué de 74% en absence de FV. Par la suite, Campbell et al (Campbell et al. 2009), 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 des CML est beaucoup plus important que celui généré à la surface des HUVEC. Ce résultat suggère que la différence d'activité du FV exprimée sur les trois types cellulaires est le mécanisme dominant. Toutefois, l'ensemble des mécanismes impliqués dans la génération et l'inhibition de la thrombine à la surface des CML vasculaires restent à élucider.

#### **III.4. Effets cellulaires de la thrombine sur le remodelage vasculaire**

L'interface entre la coagulation et la paroi vasculaire est complexe, et la frontière entre ces deux systèmes ne peut pas être définie simplement. Il n'est pas surprenant, alors, que la molécule centrale de la coagulation sanguine, la thrombine, a aussi de profonds effets sur plusieurs aspects biologiques de la paroi vasculaire, comme la prolifération, la différenciation, la migration des CML ou des CE, la réponse inflammatoire, la production de la MEC, le développement vasculaire, l'athérogénèse et l'angiogénèse. (Patterson et al. 2001) Vu et al. ont découvert le premier récepteur de la thrombine, appartenant à la famille des récepteurs PARs (tableau IV) et maintenant dénommé PAR1. Un seul mécanisme est impliqué dans l'activation de ces récepteurs par une protéase (telle que la thrombine) : celle ci peut cliver l'extrémité extracellulaire du récepteur, libérant un peptide d'activation qui, à son tour, sert comme ligand pour le récepteur (PAR) et induit une signalisation transmembranaire aboutissant ainsi à la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance (Figure 11) (Vu et al. 1991).



**Figure 11** : Mécanisme de l'activation de PAR1 par la thrombine (d'après Caughlin 2000)



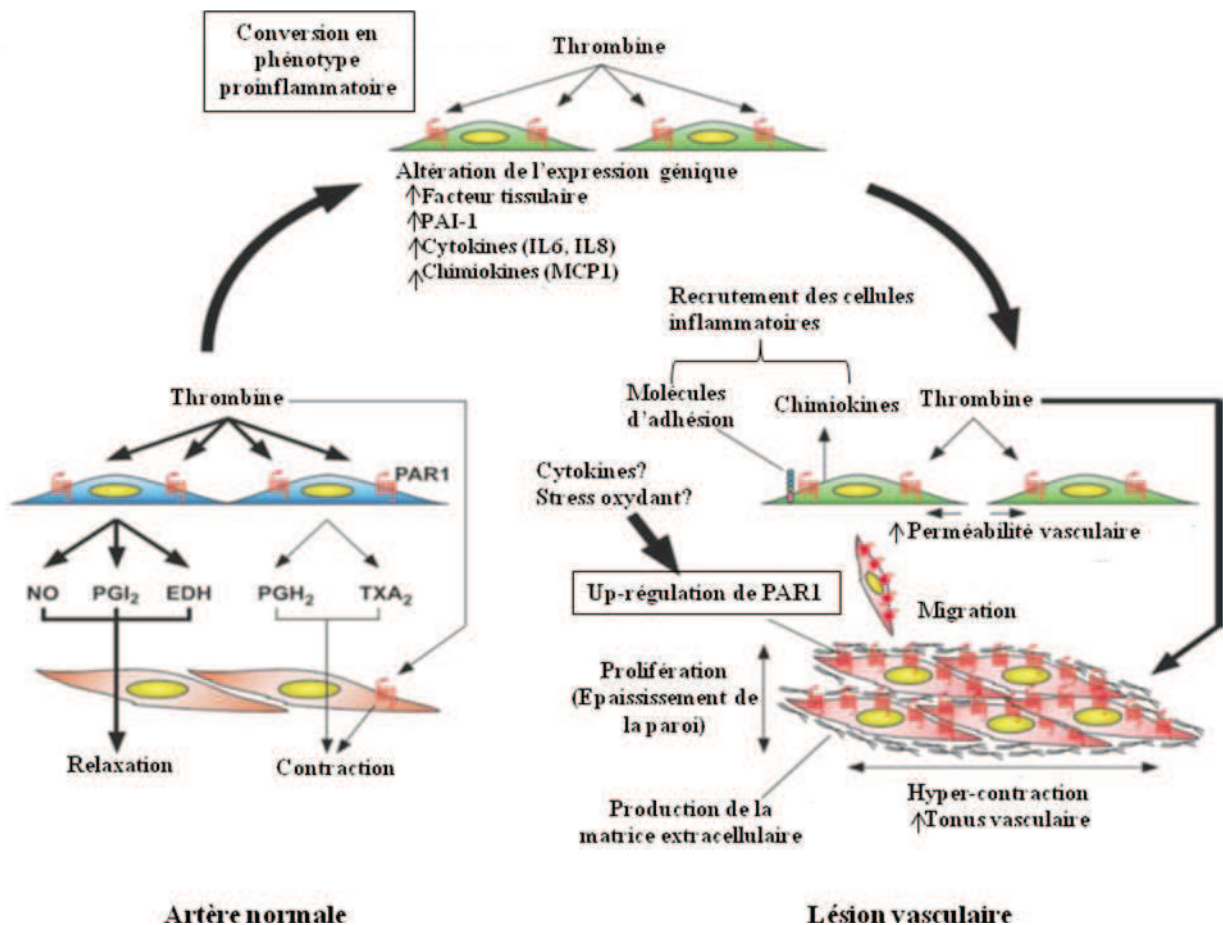
**Tableau IV :** Les PARs dans le système vasculaire. (D'après Hirano 2007 et Hirano et Kanaide 2003). VCAM : l'adhésion cellulaire vasculaire molécule-1, ICAM : molécule d'adhésion intercellulaire

	<b>Activateurs</b>	<b>Inhibiteurs</b>	<b>Effets cellulaires</b>
<b>PAR-1</b>	Thrombine Plasmine VIIa Xa PCa	Plasmine Trypsine Cathepsine G Protéinase 3 Elastase	<i>CE</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Relaxation</li> <li>• Contraction</li> <li>• Expression de P-Selectine, ICAM, VCAM</li> <li>• Angiogenèse</li> <li>• Perméabilité vasculaire</li> </ul> <i>CMLV</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Contraction</li> <li>• Prolifération</li> <li>• Hypertrophie</li> <li>• Production de MEC</li> </ul> <i>Développement du système vasculaire</i> <i>Activation plaquettaire (Homme et pas souris)</i>
<b>PAR-2</b>	VIIa Xa PCa	Plasmine Cathepsine G Protéinase 3 Elastase	<i>CE</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Relaxation</li> <li>• Contraction</li> <li>• Angiogenèse</li> </ul> <i>CMLV</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Contraction</li> </ul>
<b>PAR-3</b>	Thrombine	Cathepsine G Elastase	<i>Agrégation plaquettaire (souris)</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cofacteur pour l'activation de PAR-4</li> </ul>
<b>PAR-4</b>	Thrombine Plasmine		<i>Agrégation plaquettaire (Souris et Homme)</i>

Au niveau physiologique, l'interaction de la thrombine avec son récepteur PAR1 dans les CML permet aux cellules de se relâcher et se contracter par la production des différentes molécules (Figure 11). Au niveau pathophysiologique, la thrombine peut agir comme un facteur de croissance participant à la régulation de la prolifération des CML dans le remodelage vasculaire. Ce remodelage intervient dans les processus d'athérosclérose,

d'hypertension et de resténose. Les récepteurs PAR1, 2 et 4 potentialisent les effets de la thrombine sur la migration (McNamara et al. 1993), la prolifération et l'hypertrophie des CML (Borssof et al. 2009). En réponse aux contraintes mécaniques (20% de déformation), il existe une augmentation de l'expression de PAR1 dans les CML, qui participe à la prolifération cellulaire induite par la thrombine (Nguyen et al. 2001). Il a été montré que les trois MAP kinases : ERK, JNK et p38, MAPK peuvent être activées par la thrombine dans les CML (Rao et al. 1995; Rao et al. 1996; Kanda et al. 2001). En effet, la thrombine participe à la régulation de plusieurs réponses cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose par l'intermédiaire de ces voies de signalisation (Figure 12).

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



**Figure 12 :** Les divers effets physiologiques et pathologiques de la thrombine sur les cellules vasculaires (d'après Hirano 2007).

Dans une artère normale, la thrombine induit soit une vasorelaxation endothélium-dépendante due à la production de NO ou de PGI<sub>2</sub>, ou une hyperpolarisation endothélium-dépendante (EDH). La thrombine induit également, une vasoconstriction endothélium-dépendante par production de la prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) ou du TXA<sub>2</sub>, ou, en fonction du type de l'artère, une contraction directement du muscle lisse. *Via* PAR1 présent à la surface des CE, la thrombine provoque également une modification de l'expression de multiple gènes, qui sont liés au phénotype pro-inflammatoire, tels que le PAI-1, l'IL6, l'IL8, la protéine chimiotactique monocytaire-1 (MCP-1), l'adhésion cellulaire vasculaire molécule-1 (VCAM1) ou la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM1).

Lors d'une lésion vasculaire, l'expression de PAR1 dans le muscle lisse est régulée positivement sans doute par l'action de cytokines, ou du stress oxydant. Par conséquent, ces effets de la thrombine sur les CML tels que la contraction, la migration, la prolifération, l'hypertrophie et la production de la MEC sont amplifiés lors d'une lésion vasculaire ; cela contribue à une augmentation du tonus vasculaire, un épaississement interne, et la formation néointimale. D'autre part, une augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le PAR1 endothéliale contribue également à la physiopathologie des lésions vasculaires (Hirano 2007).

### **III.5. La dysfonction endothéliale**

L'endothélium est l'un des plus importants organes du corps. La perte de sa capacité à remplir ses fonctions constitue un état pathologique appelé dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale est associée à plusieurs pathologies et elle a été caractérisée dans l'obésité, la résistance à l'insuline, l'hypercholestérolémie, le diabète et l'hypertension artérielle (Steinberg et al. 1996, Mather et al. 2002, John et Schmieder. 2003). Plusieurs études portant sur la dysfonction endothéliale considèrent celle-ci comme étant une diminution de la bioactivité du NO suite à une diminution de sa production ou à une augmentation de sa consommation. Le NO et l'endothéline-1 (ET-1), le plus puissant agent vasoconstricteur endogène, sont des antagonistes mutuels. Ils agissent l'un sur l'autre afin de maintenir un équilibre dans le tonus vasculaire. Dans une situation de dysfonction endothéliale où la biodisponibilité du NO diminue, l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 prend le dessus et peut causer des dommages vasculaires importants en plus de promouvoir l'athérogenèse. Il a été établi qu'il existe une forte corrélation entre le stress oxydatif et la dysfonction endothéliale. Lors de maladies cardiovasculaires, l'élévation de la production de l'anion O<sub>2</sub><sup>-</sup> semble être à l'origine de cette dysfonction endothéliale (Cai et Harrison 2000).

Par exemple, il a été démontré que le ONOO<sup>-</sup> avait la capacité d'oxyder le cofacteur BH<sub>4</sub> ce qui réduit sa disponibilité et favorise la production de O<sub>2</sub><sup>-</sup> suite au découplage de eNOS (Milstien et Katusic 1999). Une autre étude, effectuée sur un modèle animal d'hypertension, a rapporté que de la dysfonction endothéliale était observée seulement lorsque l'expression de eNOS et la production de O<sub>2</sub><sup>-</sup> étaient simultanément augmentées, menant ainsi à la formation de ONOO<sup>-</sup> (Bouloumié et al. 1997). D'autre part, l'insuline exerce son effet vasodilatateur, lequel constitue un important déterminant physiologique de son action glucorégulatrice, via la production et libération de NO par les CE. Par conséquent, une réduction de la biodisponibilité du NO via la neutralisation de ce médiateur par l'anion O<sub>2</sub><sup>-</sup> peut contribuer de manière significative à l'établissement de la résistance à l'insuline et de l'hyperinsulinémie, en réduisant le recrutement capillaire et ainsi la distribution de l'insuline et du glucose à travers les tissus insulino-sensibles.

### **III.6. La réactivité vasculaire**

L'exploration de la réactivité de la paroi artérielle face à des agents vasoconstricteurs ou vasodilatateurs a été définie sous le terme de réactivité vasculaire. Cette réactivité se trouve être altérée chez les sujets hypertendus. En effet, il a été démontré que la vasodilatation endothélium-dépendante était altérée dans l'aorte et l'artère mésentérique de SHR de différents âges comparativement au WKY (Young et al. 1995 ; Bauersachs et al. 1998). Cependant, dans l'aorte de SHR jeune, il a aussi été rapporté une relaxation accrue suite à la stimulation par le carbachol, un analogue de l'acétylcholine (Chamiot-Clerc et al. 2001). Chez le SHR adulte, aucune différence n'a été démontrée en ce qui concerne la relaxation endothélium-indépendante tandis que chez le SHR beaucoup plus âgé, une altération de cette réponse a été notée (Ülker et al. 2003, Bauersachs et al. 1998). Il a aussi été montré que la contraction induite par l'activation du système nerveux sympathique était plus élevée chez le SHR comparativement au WKY à partir de 52 semaines et que l'élimination de l'endothélium dans les deux groupes annulait cette différence (Chamiot-Clerc et al. 2001). D'autre part, il a été proposé que la différence de contraction observée entre des préparations d'anneaux d'aorte avec et sans endothélium, représentait un bon indice de la fonction endothéliale et il a été démontré que mesuré ainsi, cet indice était significativement plus élevé chez le SHR jeune (5 semaines) que chez le WKY du même âge, mais qu'il diminuait sous les niveaux du groupe contrôle lorsque l'animal prenait de l'âge (Safar et al. 2001). Ces derniers résultats suggèrent la présence de mécanisme(s) compensatoire(s) chez le jeune SHR et l'installation d'une dysfonction endothéliale avec l'âge. Au niveau des CML vasculaires, certains auteurs ont démontré une diminution des niveaux basaux de cGMP et de sGC chez le SHR jeune et âgé

(Ruetten et al. 1999, Klöb et al. 2000). D'autres laboratoires, par contre, ont noté une augmentation des niveaux basaux de cGMP chez le SHR ainsi que lors de stimulation avec un donneur de NO. Cependant, aucune différence n'a été observée lors de la stimulation avec l'acétylcholine. Ceci suggère une élévation de la sensibilité de la sGC au NO chez le SHR [Qiu et al. 1998, Wu et de Champlain 1999, Papapetropoulos et al. 1994]. Il a aussi été démontré que la voie de signalisation du cGMP était plus sensible au stress oxydatif chez le rat hypertendu (Wu et De Champlain. 1999).

#### **IV. Les modèles animaux**

##### **IV.1.1 Modèle d'hypertension**

###### **IV.1.1.1. Le modèle de rat spontanément hypertendu**

Le modèle animal le plus couramment utilisé dans la recherche cardiovasculaire est incontestablement le rat SHR. Le SHR est le résultat de l'accouplement d'une femelle à pression artérielle élevée avec un mâle Wistar non consanguin atteint d'hypertension spontanée, issu d'une souche de Kyoto, au Japon. L'accouplement s'est poursuivi entre la descendance pour la sélection de l'hypertension spontanée, définie par une pression artérielle systolique de plus de 150 mmHg persistante pendant plus d'un mois (Okamoto et al. 1963). Depuis 1968, cette souche consanguine de SHR a été développée aux Etats-Unis (cité par Kurtz et al. 1987). Les différentes colonies de SHR deviennent hypertensives à 6-8 semaines avec des pressions artérielles systoliques autour de 100 à 120 mmHg (Adams et al. 1989), puis l'hypertension se développe au cours des 12-14 semaines suivantes (McGuire et al. 1985). Comme chez l'être humain, l'hypertension se développe plus rapidement et devient plus grave chez les mâles que chez les femelles SHR (Iams et Wexler 1979). Des études *in vivo* ont montré que, dans les premiers stades de l'hypertension, le SHR présente une augmentation du débit cardiaque avec une résistance périphérique totale normale. Lorsque le SHR progresse dans un état hypertendu établi, le débit cardiaque revient à la normale et les vaisseaux sanguins hypertrophiés induisent une augmentation de la résistance périphérique totale (Smith et Hutchins 1979).

L'hypertension chez l'homme est assez difficile à étudier car il y a une importante variation individuelle dans les deux éléments déclencheurs de l'hypertension, une disposition génétique et des facteurs environnementaux, conduisant à de nombreuses variations dans les effets directs et indirects sur le système cardiovasculaire qui sont difficiles à différencier. Les chercheurs de l'hypertension artérielle ont couramment recours à l'utilisation de SHR qui a un

fond génétique uniforme et un comportement environnemental induisant des effets sur le système cardiovasculaire plus stables. Ce manque de variation inter-individuelle est l'un des principaux avantages du modèle SHR (Lindpaintner et al. 1992). Cependant, cela implique que le rat SHR ne peut être le modèle que pour l'une des nombreuses causes possibles de l'hypertension humaine.

Un autre avantage du rat SHR est qu'il possède la même progression de l'hypertension que l'homme avec des phases pré-hypertensives et progressives d'une durée d'au moins plusieurs semaines pour chaque phase (Folkow 1993).

#### **IV.1.2. Rat spontanément hypertendu stroke prone (SHRSP)**

Sélectionné parmi une souche SHR possédant une pression sanguine élevée et une forte tendance à mourir d'un accident vasculaire cérébral (AVC), le SHRSP est un bon exemple de lésions vasculaires cérébrales développées spontanément dans des modèles animaux (Okamoto et al. 1974). C'est le modèle animal d'AVC spontané le plus utilisé et il est considéré comme un modèle animal unique dans lequel autant la prévention que l'incidence des survenues spontanées de lésions AVC peuvent être étudiées expérimentalement. Cette incidence atteint 80% chez les mâles et 60% chez les femelles, avec une large artériosclérose cérébrale (Yamori 1989).

L'hypertrophie entraîne une résistance vasculaire accrue et comme les vaisseaux sanguins deviennent fonctionnellement moins réactifs et avec des plaques d'athérosclérose, il existe un risque de complications telles que l'hémorragie cérébrale, la thrombose, la néphrosclérose et des lésions myocardiques chez le SHR et notamment des lésions cérébrales chez le SHRSP (Henning et al. 2010). Par conséquent, ces modèles peuvent être utilisés pour étudier non seulement la pathogenèse et la thérapie, mais aussi la prophylaxie de l'hypertension artérielle essentielle et ses complications.

#### **IV.1.3. Rat Dahl sensible au sel (DS)**

Le rat Dahl sensible au sel (DS) a été à l'origine dérivé par Dahl à partir de la souche Sprague-Dawley sur la base du développement de l'hypertension avec un régime riche en NaCl. Lorsqu'ils sont nourris par un régime en sel normal, ces rats deviennent hypertendus, indiquant qu'il s'agit d'un modèle génétique d'hypertension avec une sensibilité au sel. Sur la base de ces considérations, Dahl et al. (1962) ont choisi après des inter-croisements de rats Sprague-Dawley et, sur la base de niveaux de pression associés à une alimentation riche en sel

(8% de NaCl), deux souches d'animaux : les rats Dahl sensibles au sel (DS) et les Dahl résistants au sel (DR).

Les animaux DS développent une hypertension artérielle systémique après un régime riche en sel, tandis que les animaux DR peuvent maintenir une pression sanguine dans des limites normales, avec le même régime alimentaire.

Les mécanismes de l'hypertension génétique sensible au sel de la souche de rats Dahl ne sont pas encore entièrement connus. En outre, les rats DS peuvent développer une résistance à l'insuline avant même que l'hypertension ne soit pleinement établie, et ces modèles manifestent une diminution de la résistance artériolaire afférente et une augmentation de la pression glomérulaire en réponse à une augmentation de pression sanguine (Campese 1994).

Les DS sont prédisposés à une néphropathie hypertensive. Les lésions hypertensives glomérulaires ont été traditionnellement caractérisées par une prolifération mésangiale, une accumulation de la matrice et une glomérulosclérose, en plus d'une dysfonction endothéliale (Nagase et al. 2006).

#### **IV.1.4. Modèles transgéniques d'hypertension**

Des modèles transgéniques d'hypertension peuvent être générés par une surexpression d'un gène spécifique. Ce sont d'excellents modèles pour étudier le rôle d'un gène spécifique dans la pathogenèse de l'hypertension. Un représentant de ce type d'hypertension est le rat TGR (mREN2) 27 développé par Mullins et al. (1990), qui ne possède pas de rénine rénale endogène (Bader et al. 1992). Le TGR développe une hypertension (200 à 260 mmHg de pression systolique moyenne) au début de la 5<sup>ème</sup> semaine d'âge, présente une hypertrophie des myocytes et seulement dans une faible mesure, une hyperplasie et une dysfonction endothéliale plus importantes que le SHR à un âge et une pression sanguine similaires (Mullins et al. 1990).

Bien que le modèle ne soit pas similaire à l'hypertension humaine, il permet *in vivo* l'analyse des conséquences d'activation sévère et monogénique du système renine angiotensine (RAS pour *Renin Angiotensin System*) et permet l'identification des caractéristiques de l'hypertension après activation du RAS.

#### **IV.1.5. Rat hypertendu Borderline**

Des études sur le rat hypertendu borderline (BHR) ont démontré le rôle important que peuvent jouer les facteurs génétiques dans la médiation à la fois des réponses comportementales et cardiovasculaires face aux stress environnementaux.

Le BHR est un modèle génétique d'hypertension induite par l'environnement et il est issu d'un croisement entre un rat SHR et le rat WKY normotendus (Sanders et Lawler 1992). Les mécanismes par lesquels le stress environnemental produit l'hypertension dans le BHR n'ont pas été identifiés. Cependant, le système nerveux sympathique est impliqué. Une augmentation de la concentration en noradrénaline au cours d'un stress environnemental aigu a été observée chez les rats BHR, et les changements de la réactivité vasculaire induits par le stress peuvent contribuer à l'adaptation hémodynamique différentielle au stress observé chez les rats WKY et BHR (Fuchs et al. 1998). Le rat BHR est caractérisé par une concentration plasmatique élevée en vasopressine, vasopressine exogène induite l'action hyperpressive et l'hypertrophie cardiaque.

#### **IV.2 Modèle de caractérisation de la différenciation du muscle lisse**

Le modèle de souris d'invalidation conditionnelle et inductible du gène SRF spécifique du muscle lisse par recombinaison homologue (SMKO pour smooth muscle knock-out) est incontestablement un modèle de choix pour l'étude des altérations et du rôle de la différenciation des CML vasculaires dans les pathologies vasculaires. Ces souris sont des C57Bl/6 devenues mutantes conditionnelles de la SRF à l'aide de stratégie Cre-loxP. De génotype SM22-CreERT2ki, leur génération a été réalisée comme décrit précédemment (Parlakian et al. 2004 ; Kuhbandner et al. 2000). Ces souris SRF SMKO sont traitées au tamoxifène pour activer l'excision de l'exon 2 SRF médié par Cre-ERT2 CML spécifique et ainsi l'inactiver. Des études ont montré que cette extinction ciblée de l'expression de SRF par recombinaison homologue dans les fibres squelettiques post-embryonnaires de ces souris entraîne l'apparition de scolioses et une surmortalité par détresse respiratoire, caractéristiques d'une faiblesse musculaire (Charvet *et al.* 2006).

Alors que la réduction de l'expression du gène SRF a été associée à une insuffisance cardiaque chez l'homme (Chang *et al.* 2003), la surexpression de SRF est associée à un phénotype hypercontractile dans les artères du cortex cérébral et de la maladie d'Alzheimer (Chow *et al.* 2007) Chez ce modèle de souris Cre-lox, l'altération de l'expression de SRF cardiaque dans le cœur adulte et postnatale induit une progression rapide vers une cardiomyopathie dilatée corrélée avec un faible niveau de polymérisation d'actine (Parlakian *et al.* 2005 ; Gary-Bobo *et al.* 2008 ; Diguet *et al.* 2011). L'inactivation du gène SRF CML-spécifique dans des embryons de souris induit une diminution importante d'actine /des faisceaux des filaments intermédiaires dans les CML (Miano *et al.* 2004), alors que l'inactivation du gène SRF spécifique des CMLviscérales chez les souris adultes, conduit à un



grave trouble de la motilité, ce qui démontre que SRF joue un rôle crucial dans le maintien de la contractilité du muscle lisse viscérale (Mericskay *et al.* 2007).



*Objectifs*



L'hypertension qui est un facteur de risque important des maladies cardiovasculaires et maladies cérébro-vasculaires, provoque des lésions vasculaires conduisant au remodelage vasculaire et un état d'hypercoagulabilité (Lip et Li-Saw-Hee, 1998). Au niveau histopathologique, ce concept est soutenu par la survenue fréquente de sténose et d'occlusion artérielle et la formation d'un thrombus chez les patients souffrant d'hypertension. Des études cliniques et épidémiologiques sur les paramètres hémostatiques ont également démontré que l'hypertension est associée avec un état d'hypercoagulabilité représenté par une élévation des niveaux de fibrinogène (Cushman et al et al. 1996 ; Ishikawa et al. 1997), de facteur von Willebrand (Blann et al. 1993), de PAI-1 (Junker et al. 1998 ; Landin et al. 1990 ; Lemme et al. 1996 ; Phillips et al. 1993), des D-dimères de fibrine (Lee et al. 1995) et de l'activité du FVII (Junker et al. 1998 ; Phillips et al. 1993 ; Van Wersch, 1993). En clinique, il est cependant difficile d'estimer la contribution de l'hypertension à elle seule dans la coagulation sanguine car plusieurs facteurs de risque coexistent. Par conséquent, il est utile de vérifier expérimentalement si l'hypertension par elle-même confère un état d'hypercoagulabilité dans un modèle animal, le rat spontanément hypertendu.

Les objectifs de ce travail sont les suivants :

- La mise en évidence de modifications de la génération de thrombine *in vitro* dans des plasmas issus de de modèles animal d'hypertension et la recherche des déterminants plasmatiques et cellulaires de ces modifications ;
- L'étude de l'expression de molécules pro- et anti-coagulantes dans les parois artérielles issues de ce modèle animal d'hypertension et de leur capacité à modifier la balance hémostatique plasmatique ;
- L'évaluation de la contribution respective des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules endothéliales aux phénotypes globaux ;
- L'étude du rôle de la thrombine sur le tonus musculaire.
- L'étude de l'implication de l'état de différenciation des CML dans la rigidité artérielle avec l'utilisation d'un modèle invalidé pour un facteur de différenciation ;



*Matériels  
et méthodes*





## **I. Animaux**

Les rats SHR d'Okamoto et les rats Wistar ont été obtenus de l'élevage des laboratoires Charles River et de Janvier. Nous avons utilisé des rats âgés de 12 semaines et des rats âgés de 5 semaines.

Les souris invalidées pour le gène SRF du muscle lisse ont été également utilisées. Pour générer ces souris, des souris Sf/Sf-SM22CreERT2ki / + âgées de 4 mois (souris SRFSMKO) ont été injectées par voie intrapéritonéale avec 1 mg de tamoxifène (TAM) (Sigma) dans 100 µL d'huile d'arachide pendant 3 jours. Les souris contrôles (SF / SF de la même portée) ont été systématiquement injectées avec du TAM pour normaliser les effets dus au TAM. Toutes les expériences ont été réalisées chez ces souris 15 jours après l'injection du TAM.

Les expériences sont réalisées en accord avec les recommandations de la communauté européenne (directives 86/609/EEC) et du comité d'éthique de l'INSERM.

## **II. Prélèvements de sang et d'organes**

Les rats sont anesthésiés sous un flux continu d'isoflurane (4-5 %, débit d'oxygène 1,5 L/min). Un cathéter est introduit dans l'artère carotide et le sang est prélevé avec comme anticoagulant du citrate (106 mM) L'animal est ensuite sacrifié par exsanguination et l'aorte, le foie et l'artère carotide non cathétérisée sont prélevés et conservés à -80°C à l'exception de l'aorte thoracique. Celle-ci est prélevée délicatement, nettoyée et dégraissée sous la loupe puis découpée en anneaux de 2 mm. Ces derniers sont ensuite lavés dans du tampon d'Hépès (HBS pour *Hepes Buffered Saline*, composition : 20 mM Hépès, 140 mM NaCl, 5 g/L albumine, pH 7,35) pendant 1 heure. Neuf anneaux issus d'une aorte ont été gardés pour chaque animal pour des expériences de thrombinographie et les autres sont conservés à -80°C.

## **III. Isolement de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses aortiques de rat**

Les CE et les CML vasculaires ont été obtenues des deux groupes de rats SHR et Wistar et elles sont isolées selon le protocole de Battle et al (Battle et al. 1994). Après anesthésie à l'isoflurane, les rats sont sacrifiés par exsanguination et l'aorte thoracique est prélevée jusqu'à la crosse sous une hotte à flux laminaire, en évitant de toucher le diaphragme (la limite entre le thorax et le péritoine) et surtout les organes digestifs (contamination bactérienne). Une fois que les aortes de 4 rats sont prélevées, l'intérieur des artères est rincé par du tampon phosphate salin (PBS pour *phosphate buffered saline*, composition : 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Invitrogen). L'adventice est enlevée aseptiquement sous loupe,

et les 4 artères sont ensuite coupées en anneaux, mises toutes dans un même tube de 15 mL et incubées au bain-marie sous agitation avec de la collagénase I (Worthington) à 37°C. Après 40 minutes d'incubation, les anneaux sont resuspendus avec une pipette 10 fois exactement puis filtrés sur une compresse stérile placée sur un tube Falcon. Le filtrat est centrifugé à 570 g pendant 5 minutes et les cellules endothéliales récupérées dans le culot qui est resuspendu dans du milieu adapté aux cellules endothéliales et mises à adhérer dans une flasque de 25 cm<sup>2</sup> pendant 40 minutes. Après ce temps, les cellules sont lavées 2 fois avec environ 2,8 mL de milieu de culture par boîte afin d'enlever les cellules non adhérentes, puis elles sont remises en culture à 37°C. Les anneaux récupérés de la compresse, sont incubés sous agitation pendant 1 heure à 37°C en présence de collagénase II (Worthington) à 1 mg/mL et d'élastase I (Worthington) à 0,5 mg/mL dans du PBS. Après 1 heure, la digestion est arrêtée en ajoutant la même quantité de milieu de culture DMEM/F-12 (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco®) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma®) et des antibiotiques (100 U/mL de pénicilline- streptomycine). Les cellules sont ensuite centrifugées à 250 g pendant 10 minutes et comptées à l'aide d'un hématocytomètre (Naeuber). Elles sontensemencées à raison de 4000-5000 cellules/cm<sup>2</sup> dans les flasques de culture de 75 cm<sup>2</sup> ou de 25 cm<sup>2</sup> contenant 10 mL ou 5 mL respectivement du même milieu de culture en présence de SVF et des antibiotiques. Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à confluence des cellules. Les caractéristiques endothéliales ou musculaires lisses des cellules de rat ont été vérifiées par marquage par le CD31 et l' $\alpha$ -actine du muscle lisse respectivement.

### **III.1. Culture cellulaire**

#### **III.1.1. Milieux de culture**

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

Milieu de culture des CML de rat : DMEM/F-12 (Gibco®) additionné de 10% de SVF et de 100 U/mL de pénicilline – streptomycine.

Milieu de culture des CE de rat : Endothelial Cell Growth Medium-2 (EGM®-2) additionné de 2% de SVF, des facteurs de croissance (Hydrocortisone, FGF-B, VEGF, R3-IGF-1, acide ascorbique, hEGF), héparine, GA-1000 (Gentamycine), et du sérum de cheval à raison de 10%.

### **III.1.2. Croissance cellulaire**

Pour des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup> ou de 75 cm<sup>2</sup>, le milieu est vidé, puis les cellules en culture sont rincées deux fois avec du PBS pour éviter une inhibition du SVF sur la trypsine. Un volume de 5 mL de trypsine-EDTA (0,05 %, Gibco®) a été ensuite ajouté et les boîtes sont 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 5 mL de milieu de culture DMEM/F-12 (Gibco®) additionné de SVF (Sigma®) sont ajoutés afin de neutraliser l'action de la trypsine. Une centrifugation à 250 g pendant 10 minutes à température ambiante est ensuite effectuée. Le culot de cellules est resuspendu dans 1 mL milieu de culture adapté, puisensemencé dans une nouvelle boîte de culture et complété avec du milieu (10 mL pour les flasques de 75 cm<sup>2</sup>, 5 mL pour les flasques de 25 cm<sup>2</sup>).

### **III.2. Immunocytochimie**

Les cellules en culture primaire sur des plaques sont rincées avec du PBS puis fixées avec du paraformaldehyde 4% (w/v dans de PBS) pendant 10 minutes et ensuite rincées trois fois avec du PBS. Les cellules sont perméabilisées dans du tampon Triton X100 0.5% (v/v dans du TBS, Tris 50 mM, NaCl 175 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02 %, pH 7,9) pendant 15 minutes. Les anticorps primaires anti- $\alpha$ SMA (1A4-Sigma) pour les CML, anti-vWF et anti-CD31 (Abcam) pour les CE, sont préparés dans du TBS contenant du Tween 20 à 0,5 % et de la BSA à 1%. Les échantillons sont incubés avec les anticorps primaire à température ambiante pendant 1 heure sous agitation lente. Après trois lavages dans du TBS-T, les cellules sont incubées avec l'Envision (Vector Laboratories) pendant 30 minutes à température ambiante. Après deux lavages avec du PBS, le labteck est démonté et les lames sont plongées dans du DAB (DAKO LSAB®) dilué au 1/1000 dans du PBS. Les cellules sont ensuite déshydratées à l'éthanol 70% puis au toluène et les lames sont montées à l'Eukitt (O. Kindler gmbh & co mikroskopische gläser) et observées au microscope.

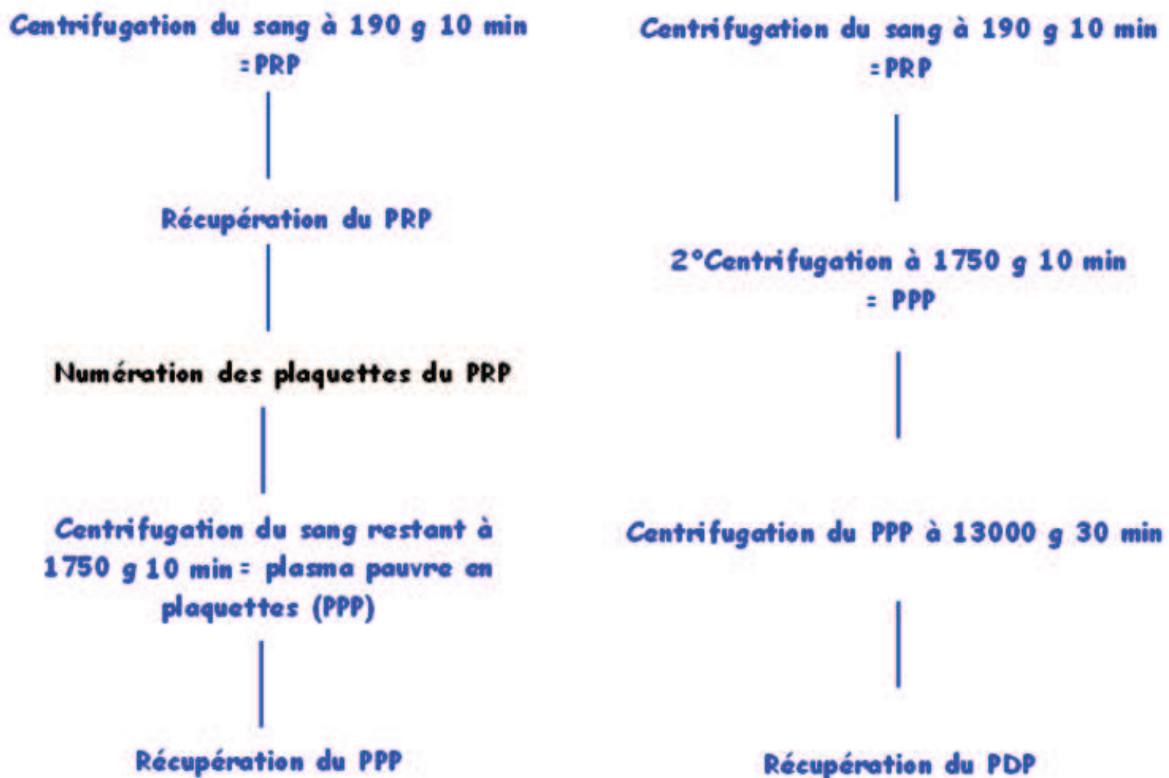
## **IV. Mesure de la génération de thrombine (Thrombinographie)**

### **4.1. Définition générale de la technique**

C'est le suivi de la concentration en thrombine active dans du plasma stimulé dans des conditions appropriées, grâce à l'enregistrement continu de la fluorescence libérée lors du clivage d'un substrat fluorogène spécifique de la thrombine.

## IV.2. Préparation des spécimens plasmatiques (PRP-PPP-Pool de PPP)

Le sang des rats, prélevé comme décrit précédemment, est mis dans un tube contenant une solution citrate à 106 mM à raison d'un volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang. Après avoir mesuré la numération sanguine, la préparation des différents spécimens plasmatiques a été réalisée selon les protocoles résumés sur la figure 13.



**Figure 13** : préparation de plasma riche en plaquettes (PRP) et plasma dépourvu en plaquettes (PDP) à partir de sang de rat. PPP, plasma pauvre en plaquettes.

### IV.2.1. Plasma riche en plaquettes (PRP)

Le PRP a été préparé par centrifugation du sang à 190 g pendant 10 minutes à 20°C. Le PRP se présentant comme une couche trouble à la surface du tube, a été récupéré et ajusté à 500 G/L en plaquettes par addition de plasma pauvre en plaquettes (PPP) autologue obtenu par centrifugation du sang restant à 1750 g pendant 10 minutes à 20°C. Il a été ensuite étudié dans les 30 minutes qui suivent sa préparation.

#### **IV.2.2. Plasma Dépourvu en plaquettes (PDP)**

Le PPP obtenu par centrifugation à 1750 g pendant 10 minutes a été centrifugé à 13000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est conservé à -80°C.

Un pool de PDP a été préparé en mélangeant les PPP obtenus à partir du sang d'un groupe de 10 rats (~10 mL par rat de 350 g) après une centrifugation à 13000 g pendant 30 minutes à 4°C, puis aliquoté et conservé à -80°C.

#### **IV.3. Conditions de la réalisation du test**

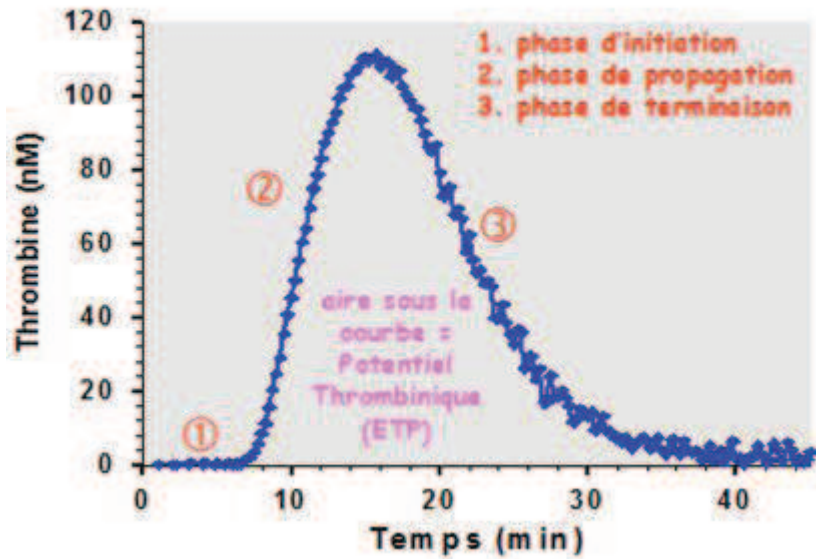
Les mesures thrombinographiques ont été réalisées dans le fluorimètre Fluoroskan Ascent (Labsystems) avec le logiciel dédié Thrombinoscope® version 3.0.1.0.55 (Synapse, Maastricht, Pays-Bas) selon les protocoles adaptés de Hemker HC *et al.* (Hemker HC *et al.*, 2003).

Un substrat fluorogène de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem) est 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 avec un intervalle de mesure de 15 secondes.

Un calibrant (mélange d'un complexe  $\alpha$ 2-macroglobuline/thrombine humaine) a été ajouté dans la plaque. Il sert à corriger les effets de la 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®. Deux puits contenant 20  $\mu$ L de calibrant (Synapse, Maastricht, Pays-Bas) et 80  $\mu$ L de spécimen plasmatique ont été inclus dans la plaque pour chaque plasma étudié. Les échantillons étudiés ont été mis en triple pour chaque mesure.

##### **IV.3.1. Les paramètres thrombinographiques**

La cinétique de génération de thrombine enregistrée est appelée thrombinogramme (Figure 14) et se découpe schématiquement en trois phases : initiation, propagation et terminaison décrites précédemment.



**Figure 14 :** Thrombinogramme typique de génération de thrombine représentant les 3 principales phases de la cascade de coagulation.

Il permet de mettre en évidence plusieurs paramètres (figure 15) :

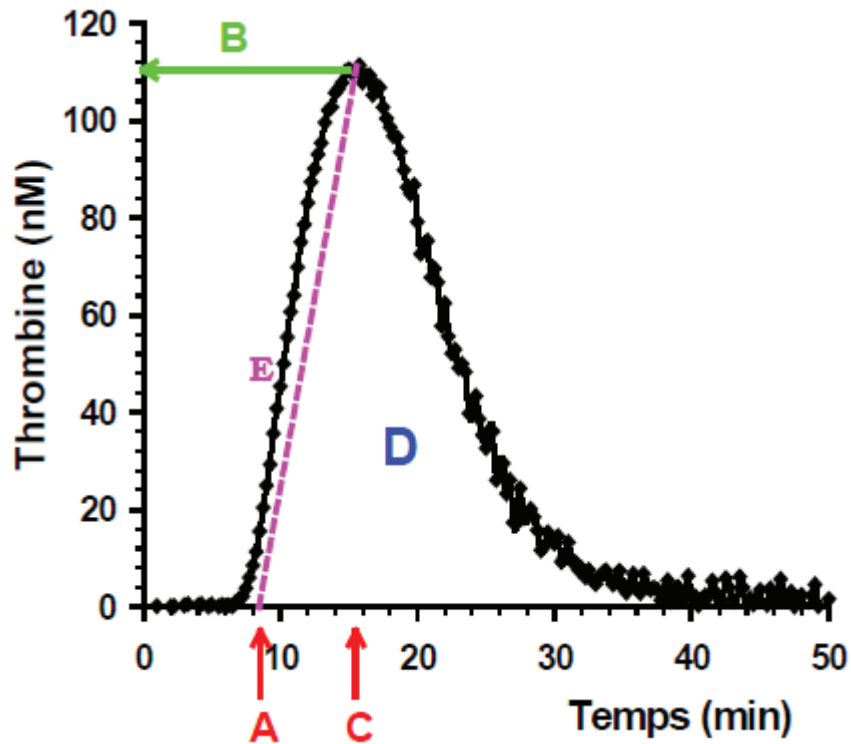
Le temps de latence avant la génération explosive de thrombine ; il correspond à la durée de la phase d'initiation (min).

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

Le temps pour atteindre le pic qui donne le temps écoulé entre l'initiation de la réaction et le pic de génération de thrombine (min)

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

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



**Figure 15 :** 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).

#### IV.1.2 Mesure de la génération de thrombine au niveau du plasma riche ou dépourvu en plaquettes

Les PRP et les PDP des rats ont été décongelés dans un bain-marie à 37°C pendant 15 minutes. Dans des microplaques 96 puits en polypropylène fond rond (Greiner), 5 µL de TF recombinant humain à 0,5 ou 50 pM (d'une concentration mère de 500 pM, Dade Behring) ont été déposés en triple pour chaque concentration et chaque spécimen à étudier, au fond du puits. Un volume de 5 µL de vésicules phospholipidiques (VP) composées de phosphatidyl choline / phosphatidyl serine/ phosphatidyl éthanolamine (PC/PSer/PE) y est ajouté dans chaque puits, uniquement quand il s'agit de PDP pour apporter une surface anionique et du tampon HBS pour avoir un volume total de 20 µL. Pour le PRP, le même volume en tampon est ajouté à la place des VP dans chaque puits dédié. Et enfin, 80 µL de chaque spécimen de plasma à température 37°C sont ajoutés. Deux puits de calibrant par spécimen étudié sont préparés avec 20 µL de calibrant et 80 µL de spécimen plasmatique. La plaque est ensuite mise dans l'appareil de mesure. Après avoir rincé l'appareil à thrombinographie par un tampon de rinçage (composition : 20 mM Hépès, 60 g/L albumine, 0,02 % azoture de sodium,

pH 7,35 ; additionné de 1,1M CaCl<sub>2</sub> ), 20 µL le tampon substrat (composition : 20 mM Hépès, 60 g/L albumine, 0,02 % azoture de sodium, pH 7,35 ; additionné de 1,1M CaCl<sub>2</sub> et de substrat fluorescent Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem) recalcifié ont été distribué dans chaque puits déjà préparé et la génération de thrombine est ainsi déclenchée et la mesure entamée.

#### **IV.1.3. Mesure de la génération de thrombine à la surface de la paroi aortique, des CML et des CE.**

Comme pour le plasma, 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.

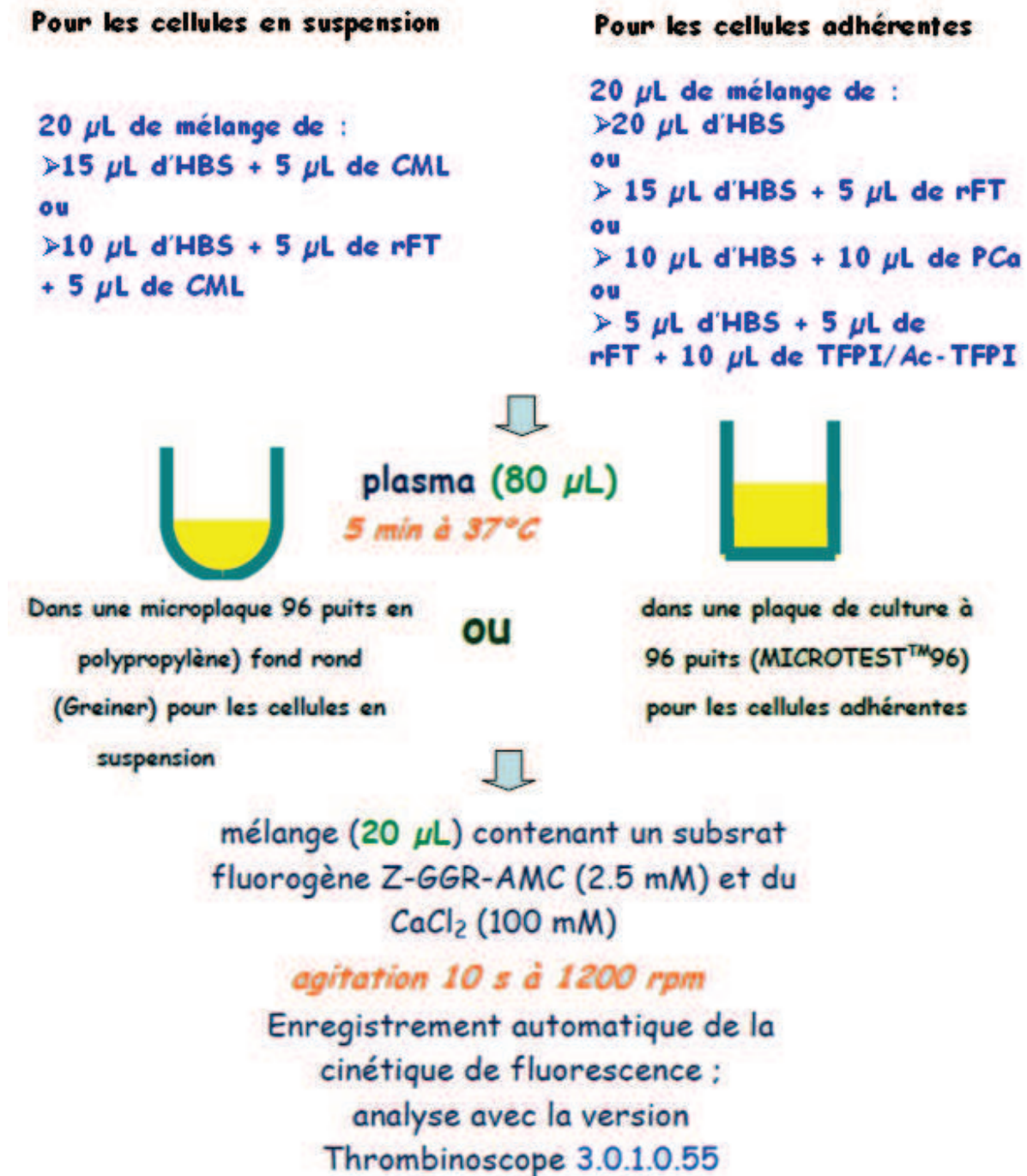
##### **IV.1.3.1. Anneaux aortiques**

Les anneaux aortiques de 2 mm de longueur ont été préparés comme décrit précédemment puis mis dans les puits d'une microplaque 96 puits en polypropylène fond rond (Greiner) avec 80 µL de pool de PDP et en présence ou non de 40 µg/mL d'anticorps anti-TFPI (American Diagnostica) ou de 10 ng/mL de TFPI (American Diagnostica) et en absence de TF.

##### **IV.1.3.2. CML et CE**

Les cellules aortiques (CE et CML) de rat SHR et Wistar ont été isolées comme décrit précédemment puisensemencées dans des plaques de culture 96 puits (MICROTESTTM<sup>96</sup> à raison de 7500 cellules/puits. Deux jours après, les cellules sont à environ 90% de confluence et ont été utilisées pour des expériences de thrombinographie en présence de 80 µL de pool de PDP de rats Wistar et en présence ou absence de Facteur Tissulaire à 5 pM ou 50 pM, de PCa à 65 nM, d'anti-TFPI à 40 µg/mL, ou de TFPI à 10 ng/mL (Figure 16).





**Figure 16 :** Protocole pour une étude en thrombinographie des cellules en suspension (CML) et cellules adhérentes (CE et CML)

## **V. Mesure des facteurs pro- et anticoagulants**

### **V.1. Mesure de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) des anneaux aortiques et des CML**

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 limitant 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 (phosphatidyl choline / phosphatidyl serine/ phosphatidyl éthanolamine (PC/Pser/PE) (60/20/20 moles %) dans du tampon TBS contenant de la BSA à 2 mg/mL. Les dépôts s'effectuent en triple dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb » pour les CML en suspension ou dans une plaque de culture (MICROTESTTM<sub>96</sub>) pour les cellules adhérentes, et un anneau par animal et par puits (pour chaque groupe de 10) dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb », à raison de :

- 50 µL de VP pour les standards, 50 µL de suspension de CML, un anneau artériel dans 50 µL de tampon HBS ou 50 µL de ce même tampon dans les puits de cellules adhérentes.
- 50 µL d'un mélange de CaCl<sub>2</sub> (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 TBS 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 minutes dans le noir et à température ambiante, l'absorbance dans la plaque de Polysorb est lue à 405 nm (lecture cinétique pendant 10 minutes avec un intervalle de mesure de 30 secondes), alors que la fluorescence dans la plaque de culture (MICROTESTTM<sub>96</sub>) est lue dans le fluorimètre Fluoroskan Ascent (Labsystems) avec le logiciel dédié (Ascent software 2.6), où elle est enregistrée pendant 30 minutes 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 minute. Le protocole est résumé dans la figure (17).



**Figure 17 :** Protocole pour la mesure de l'activité procoagulante des phospholipides.

## V.2. Mesure de l'activité du facteur tissulaire.

Nous avons utilisé un test de mesure de l'activité du TF humain (Actichrome TF, American Diagnostica) avec quelques modifications, pour mesurer l'activité du FT au niveau du PPP, à la surface des CE, des CML, et des anneaux aortiques de rat. 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 le PDP de rat :** Dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb », 25 µL de PDP ou du standard sont ajoutés à 50 µL de tampon (kit) pH 7.5 dans les puits. Un volume de 25 µL de FVIIa et 25 µL de FX humains ont été ajoutés et incubés 15 minutes à 37°C pour permettre la formation du complexe (FT<sub>(plasmatique)</sub>/FVIIa), capable de convertir le FX en FXa dans les puits. Enfin, 25 µL de substrat FXa (Spectrozyme® Xa) sont additionnés dans chaque puits. La lecture de l'absorbance se fait alors à 405 nm pendant 30 minutes avec un intervalle de 30 secondes.

**b) Pour les anneaux aortiques de rat :** Les anneaux aortiques sont incubés dans 100 µL de tampon HBS pendant 1 heure sous agitation à 4°C. Les échantillons ont été non ou dilués au ½. De ce fait, un volume de 25 µL et 12,5 µL du surnageant de ce tampon ont été ajoutés à 50 µL et à 62,5 µL respectivement, de tampon (kit) pH 7,4 dans les puits d'une plaque 96 puits Nunc « Polysorb ». Le reste de la procédure s'est faite comme décrit pour le PDP.

**c) Pour les CE et CML de rat :** Les cellules adhérentes cultivées dans une plaque de culture (MICROTEST™96) ont été lavées 2 fois avec 200 µL de tampon HBS avant l'ajout de 75 µL de tampon (kit) pH 7,4 dans les puits. Ensuite, 25 µL de FVIIa et 25 µL de FX humains ont été ajoutés et incubés 15 minutes à 37°C pour permettre la formation du complexe, 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 le standard. Puis, un volume de 25 µL du substrat de FXa (Spectrozyme® Xa) a été ajouté.

### **V.3. Mesure de l'activité du TFPI**

Le dosage est réalisé à l'aide du kit Actichrom TFPI Activity Assay (American Diagnostica) selon les informations du fabricant. Le principe du test est de mesurer, à l'aide d'un substrat chromogène, la quantité de FXa formé, quantité qui est inversement proportionnelle à l'activité du TFPI dans le plasma. Pour chaque mesure, une gamme étalon de 7 points dont la concentration en TFPI, va de 0,20 à 0 unité/mL, a été réalisée.

**a) Pour le PDP de rat :** Dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb », sont déposés 20 µL de TFPI standard, de plasma de référence, ou de PDP, puis 20 µL d'un mélange, préalablement préparé, de FT et de FVIIa. Après 30 minutes d'incubation à 37°C sous une agitation de 300 rpm (incubateur à microplaque, Heidolph Titramax 1000, Grosseron), 20 µL de FX humain sont distribués dans chaque puits. Une nouvelle incubation de 15 minutes à 37°C sous agitation est réalisée, puis 20 µL d'EDTA à 20 nM et 20 µL de Spectrozyme® FXa sont ajoutés dans chaque puits. La lecture de l'absorbance se fait alors à 405 nm pendant 30 minutes avec un intervalle de 30 secondes.

**b) Pour les anneaux aortiques de rat :** Les anneaux aortiques sont incubés dans 100 µL de tampon HBS pendant 1 heure sous agitation à 4°C. A partir de ce tampon surnageant, un volume de 20 µL et un autre dilué au 1/20 ont été préparés pour une quantité finale de 20 µL et ajoutées à 20 µL de mélange de FT et de FVIIa humains dans les puits d'une plaque 96 puits Nunc « Polysorb ». Le reste de la procédure s'est faite comme décrit pour le PDP.

**c) Pour les CE et CML de rat :** 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 20 µL de tampon (kit) pH 7,4 dans les puits. Ensuite, 20 µL de mélange de FT et de FVIIa humains ont été ajoutés et incubés 30 minutes à 37°C sous agitation. Vingt µL de FX humain sont ensuite

distribués dans chaque puits et une nouvelle incubation de 15 minutes à 37°C sous agitation est réalisée. Cette réaction est arrêtée par l'ajout de 20 µL d'EDTA à 25 mM. Le mélange contenu dans les puits de culture cellulaire (80 µL) a été ensuite transféré dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb » où les mêmes étapes ont été suivies pour le standard. Puis, un volume de 20 µL du substrat de FXa (Spectrozyme® Xa) a été ajouté. La lecture se fait en cinétique à 405 nm pendant 30 minutes à un intervalle de 30 secondes.

#### **V.4. Dosage de la prothrombine (facteur II)**

Ce dosage est réalisé dans le coagulomètre KC 10. Le principe est de diluer les échantillons à étudier dans un plasma déficient pour le facteur à doser. Ce facteur est alors l'élément limitant le temps de formation du caillot. Le dosage du FII se fait par un test mesurant le temps de Quick, c'est-à-dire le temps de coagulation par la voie extrinsèque. Chaque plasma est étudié à deux dilutions en simple. Les concentrations sont exprimées en % et calculées grâce aux courbes étalons faites avec un plasma de référence titré pour les différents facteurs de la coagulation (unicalibrator, Diagnostica Stago), 100 % étant la concentration du facteur dans un pool de plasma humain utilisé comme référence.

Pour doser le FII, 50 µL de plasma à étudier, dilué au 1/40 et 1/80 en tampon diluant facteur (Instrumentation Laboratory, Bedford, USA) puis 50 µL de plasma déficient en FII (Dade Behring) sont déposés dans chaque cupule. Les cupules sont placées à 37°C pendant 60 secondes. Le temps de coagulation est mesuré après addition de 80 µL de Thromborel S (Dade Behring).

#### **V.5. Dosage du fibrinogène (facteur I)**

Ce dosage est réalisé dans un coagulomètre KC 10. Un volume de 200 µL de plasma dilué au 1/10 et au 1/20 en tampon Owren-Koller (Diagnostica Stago), ou d'unicalibrateur humain (Diagnostica Stago) est déposé dans chaque cupule et incubé pendant 4 minutes à 37°C. Le temps de coagulation est mesuré après addition de 100 µL de Fibriquik (thrombine bovine à 100 unités NIH/mL, Biomérieux-Trinity Biotech, Bray, Ireland).

#### **V.6. Dosage des complexes Thrombine/AntiThrombine (TAT)**

Ce dosage est réalisé avec le kit Enzygnost TAT micro (Dade Behring, Marburg, Germany) en respectant les indications du fabricant. Un volume de 50 µL de tampon échantillon ainsi que 50 µL des standards ou des échantillons de PDP sont distribués dans chaque puits (le test est réalisé en double). La plaque est incubée 15 minutes à 37°C puis lavée trois fois avant l'ajout de 100 µL de solution conjuguée du kit (Anti-ATIII/POD) par puits. Après une

nouvelle incubation de 15 minutes à 37°C, 100 µL de solution chromogène-tampon/substrat (TMB) sont distribués dans chacun des puits. La plaque est incubée 30 minutes à température ambiante avant que 100 µL de solution d'arrêt POD ne soient ajoutés dans chaque puits. La lecture se fait à 492 nm. Les concentrations plasmatiques en TAT sont exprimées en µg/mL.

### **V.7. Dosage de l'antithrombine**

Le dosage est réalisé en double pour chaque échantillon avec un kit COAMATIC® Antithrombin (Chromogénix, Lexington, USA). Le principe du test est d'incuber du plasma en présence d'un excès de FXa en présence d'héparine. La quantité résiduelle de FXa est déterminée par le taux d'hydrolyse du substrat chromogène S-2765. La coloration est inversement proportionnelle au taux d'antithrombine (AT) dans une fourchette de 0 à 120 % du plasma standard (standard international). Dans une microplaque Nunc Polysorb, sont déposés 50 µL d'échantillon ou de standard ainsi que 50 µL de facteur Xa. Après 90 secondes d'incubation à 37°C, 50 µL de substrat S-2765 sont distribués dans chaque puits. La réaction est ensuite stoppée après 90 secondes d'incubation par ajout de 50 µL d'acide acétique à 20 %. L'absorbance est lue à 405 nm. La concentration en anti-thrombine est déterminée avec la gamme étalon et exprimée en %.

## **VI. Quantification de l'expression génique par PCR en temps réel (PCRq)**

### **VI.1 Extraction des ARN**

#### **a) Du foie :**

A l'aide d'un mortier contenant de l'azote liquide, le foie encore congelé est écrasé et réduit à une sorte de poussière qui est ensuite reprise dans 1 mL de Trizol pour lyser les cellules hépatiques et récupérer les acides nucléiques. Le lysat est ensuite incubé avec 200 µL de formaline à température ambiante pendant 15 minutes. Une centrifugation à 12000 g pendant 15 minutes permet de différencier une phase aqueuse contenant les acides nucléiques. Cette phase est donc prélevée et un volume égal d'éthanol y est ajouté.

Les échantillons sont alors déposés sur les colonnes du kit RNeasy mini kit (Qiagen), puis l'extraction d'ARN s'effectue selon les recommandations du fournisseur. Le passage sur une colonne sélective, pour les acides nucléiques permet de les conserver. Le rinçage du produit se fait par passage successif d'un tampon RW1 du kit dans le but de conserver uniquement les ARN et les ADN. Pour éviter la contamination par de l'ADN génomique, une digestion à la DNase pendant 15 min à température ambiante a été réalisée. Finalement, l'élution des ARN se fait avec de l'eau pure dépourvue d'ARNase. Les ARN pouvant se solubiliser avec de

l'eau, ils sont entraînés au travers la colonne. Un deuxième passage permet de s'assurer que le maximum d'ARN a été récupéré et un chauffage pendant 10 min à 60°C est réalisé afin de séparer les brins d'ARN éventuellement appariés. L'ARN est mis dans la glace ou conservé à -20°C.

#### **b) Des CML**

Les cellules sont rincées avec du tampon PBS, puis l'extraction d'ARN s'effectue selon les recommandations du kit Qiagen. Les cellules sont reprises dans du tampon de lyse fourni dans le kit et le lysat est déposé sur les colonnes et la même procédure que pour le foie a été suivie.

### **VI.2. Transcription reverse (RT)**

Après la purification, les ARN sont quantifiés par spectrophotométrie (Thermo Scientifique Nano Drop 1000, USA) par la lecture des densités optiques (DO) aux longueurs d'onde 260 nm et 280 nm. Une quantité de 1 µg de cet ARN a servi pour l'obtention de l'ADNc par transcription inverse en utilisant des amorces de polyT se fixant sur la séquence poly-adenylée des ARNm. La RT est réalisée dans un mélange comprenant 1 µg d'ARN, 10 µM d'oligo (dT) 15 mer, 25 mM de dNTP, des inhibiteurs de RNases, 200 unités de M-MuLV Reverse Transcriptase et le tampon de réaction à 42°C pendant 90 minutes. La réaction est arrêtée en mettant les tubes à 72°C pendant 10 minutes. Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C puis dilués pour être utilisés pour la réaction de PCR.

### **VI.3. Réaction de PCR quantitative en temps réel (PCRq)**

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

## **VII. La fonction vasculaire chez l'animal**

### **VII.1. Réactivité vasculaire sur carotide de rat**

Cette méthode a été utilisé pour étudier l'effet de la thrombine sur la contraction et la relaxation d'anneaux carotidiens des rats SHR et Wistar.

L'artère carotide est prélevée et immédiatement placée dans une solution physiologique saline (PSS) de la composition suivante (valeurs en mM) : NaCl 118 ; KCl 5,4 ; MgSO<sub>4</sub> 0,06 ;

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 ; Glucose 11,0 ; CaCl<sub>2</sub> 1,9 ; NaHCO<sub>3</sub> 25,0. Après avoir soigneusement nettoyé le tissu adipeux et conjonctif, les artères ont été coupées en anneaux de 3 mm de longueur et montés sur le myographe (Danish Myo Technology, Aarhus, Danemark). Les anneaux sont oxygénés en continu par un mélange gazeux (75 % N<sub>2</sub> ; 15 % O<sub>2</sub> ; 5 % CO<sub>2</sub>) dans un bain de PSS à 37°C.

La tension des anneaux artériels est équilibrée pendant 40 minutes pour atteindre la tension physiologique de repos de 1,0 g (4,9 mN). Au cours de la période d'équilibration, le bain de PSS est changé toutes les 15 minutes. A la fin de l'équilibration, l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium est testée par la capacité des anneaux précontractés avec une concentration de phényléphrine (PE) 10<sup>-5</sup> M à se relâcher en réponse à l'acétylcholine (Ach) 10<sup>-5</sup> M. Après, un lavage, l'effet contractile de la thrombine (FIIa) à 3 U/mL a été mesuré après incubation des anneaux pendant 30 minutes.

Les anneaux sont ensuite relavés, et les effets vasodilatateurs de la thrombine ont été mesurés après les avoir précontractés à la Phe 10<sup>-5</sup> M. Les anneaux sont ensuite lavés après 15 min d'incubation et les réponses dilatatrices à l'Ach sont étudiées sur des anneaux précontractés à 10<sup>-5</sup> M de Phe.

## **VII.2. Réactivité vasculaire sur carotide et l'artère mésentérique de souris**

Les réponses contractiles et de relaxation sont évaluées dans les carotides et les mésentères isolées de souris SRFSMKO, les souris surrexprimant SRF, SRF+ et contrôles. La carotide et la mésentère sont excisées et placées sur la glace dans du PSS de composition suivante (en mM): NaCl, 130; KCl, 3,7; MgSO<sub>4</sub>, 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2; CaCl<sub>2</sub>, 1,6; NaHCO<sub>3</sub>, 14,9 et glucose, 11. Les artères sont isolées et soigneusement nettoyées des matières grasses, et des préparations d'anneaux (longueur 2,5 mm) sont effectuées. Les anneaux sont ensuite montés sur un fil-myographe (DMT, Aarhus, Danemark), dans un bain d'organe contenant 8 ml d'une solution de PSS oxygénée maintenue à 37 °C avec un pH de 7,4. Les anneaux sont laissés à équilibrer pendant 30 minutes à une tension de repos de 1 g, en renouvelant le milieu toutes les 15 minutes. Toutes les préparations sont contractées avec une concentration sous-maximale de Phe (10<sup>-5</sup> M) suivie d'une relaxation à l'Ach pour évaluer la capacité contractile de chaque anneau. La voie α-adrénergique a été évaluée par la contraction dose dépendante provoquée par la Phe (10<sup>-9</sup> à 10<sup>-5</sup> M). La relaxation dépendante de l'endothélium est évaluée avec des concentrations croissantes en Ach (10<sup>-9</sup> à 10<sup>-4</sup> M) avec des anneaux précontractés à 10<sup>-5</sup> M de Phe, en présence ou en l'absence de 10<sup>-4</sup> M de L-NAME, un inhibiteur de l'endothélium. La sensibilité du vaisseau au NO est évaluée via la dose-réponse au



nitroprussiate de sodium donateur de NO (SNP,  $10^{-9}$  à  $10^{-4}$  M) dans des anneaux prétraités avec du L-NAME ( $10^{-4}$  M) et précontractés avec de la Phe ( $10^{-5}$  M). La réponse maximale ( $E_{max}$ ) et la concentration en agoniste provoquant 50% des réponses maximales ( $EC_{50}$ ) ont été déduites à partir des courbes dose-réponses individuelles. Ces dernières valeurs sont transformées en valeurs  $PD_2$ , qui est le logarithme négatif des valeurs d' $EC_{50}$ .



*Résultats*



### I. Analyse hématologique

Nous avons comparé la numération sanguine des rats SHR et des rats Wistar. Le sang a été prélevé avec du citrate au 1/10<sup>ème</sup> du volume total. Le tableau V montre les principaux paramètres hématologiques mesurés chez ces rats. Les rats SHR présentent un poids plus faible par rapport aux rats Wistar et ce quel que soit l'âge. Le nombre de globules rouges, l'hématocrite, l'hémoglobine, le nombre de plaquettes ainsi que le volume plaquettaire moyen se trouvent être plus élevés chez les rats SHR âgés de 12 semaines par rapport aux rats Wistar du même âge. Une numération en globules blancs et plaquettes plus élevée est également observée chez les rats SHR à l'âge de 5 semaines. Cependant, aucune différence n'est notée au niveau du nombre de globules rouges, de l'hématocrite, de l'hémoglobine ou encore du volume plaquettaire moyen. Quel que soit le stade d'hypertension, les rats SHR présentent un poids corporel significativement plus faible que celui des rats Wistar, au même âge.

Tout comme le poids, tous les paramètres hémodynamiques sont augmentés chez les animaux âgés de 12 semaines par rapport aux rats âgés de 5 semaines. Cependant, le nombre de plaquettes chez le SHR est augmenté également, alors que chez le rat Wistar, est en net diminution dans l'âge.

**Tableau V** : numération sanguine des rats SHR et des rats Wistar. Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  SEM. n= 10 pour chaque groupe des rats de 12 semaines et n=6 pour chaque groupe des rats de 5 semaines, \* p<0,05 versus Wistar, \*\* p<0,005 versus Wistar, \*\*\* p<0,0005 versus Wistar du même âge.

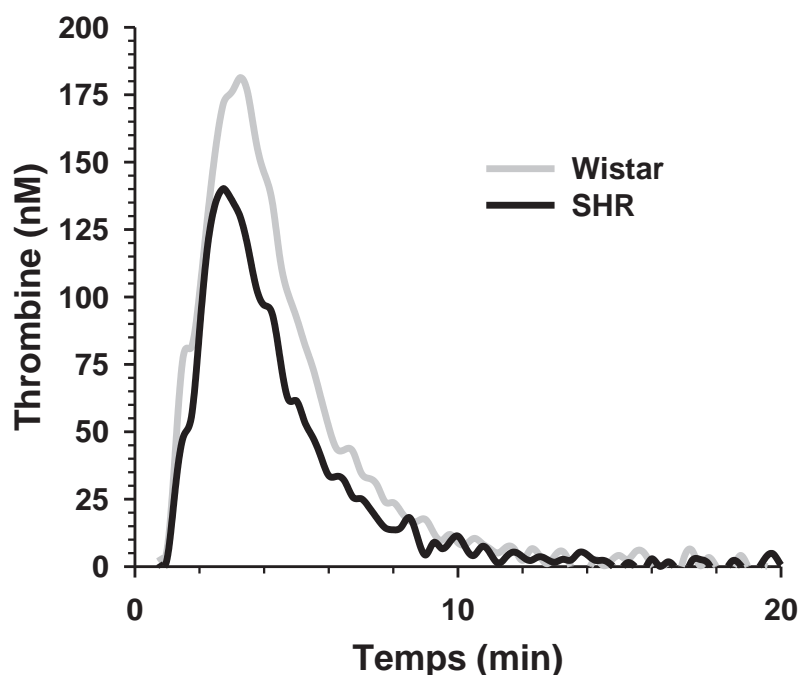
	Wistar		SHR	
	5 sem	12sem	5sem	12sem
<b>Poids (g)</b>	143 $\pm$ 2	349 $\pm$ 8	81 $\pm$ 1***	273 $\pm$ 4 *
<b>Globules rouges (<math>\times 10^{12}/L</math>)</b>	5,0 $\pm$ 0,1	6,0 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,03 *
<b>Globules blancs (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	7,0 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,3*	3,1 $\pm$ 0,1
<b>Plaquettes (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	629 $\pm$ 31	429 $\pm$ 21	497 $\pm$ 18**	527 $\pm$ 14 *
<b>Hématocrite (%)</b>	29,0 $\pm$ 0,3	32,2 $\pm$ 0,9	30 $\pm$ 0,4	36,6 $\pm$ 0,3 *
<b>Hémoglobine (g/dL)</b>	10,0 $\pm$ 0,1	11,6 $\pm$ 0,3	10,0 $\pm$ 0,1	12,8 $\pm$ 0,1 *
<b>Volume plaquettaire moyen (fL)</b>	6,0 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,1	6,0 $\pm$ 0,3	7,9 $\pm$ 0,2 *

## II. Etude de la coagulation *in vitro*

### II.1. La coagulation au niveau du plasma

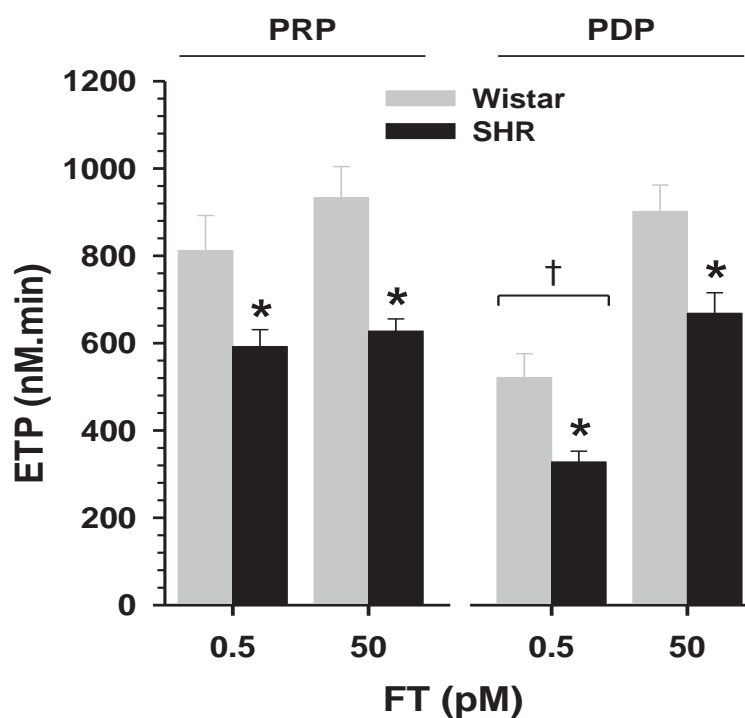
#### II.1.1. Génération de thrombine dans le plasma

Nous avons analysé la capacité de génération de thrombine dans le plasma des rats SHR et Wistar à 5 et 12 semaines par un test intégratif de génération de thrombine. Les résultats montrent des taux significativement plus faibles de thrombine générée dans le plasma des rats SHR par rapport au plasma des rats Wistar. La figure 18 A montre un profil typique de génération de thrombine dans du PRP déclenché avec une faible concentration de facteur tissulaire.

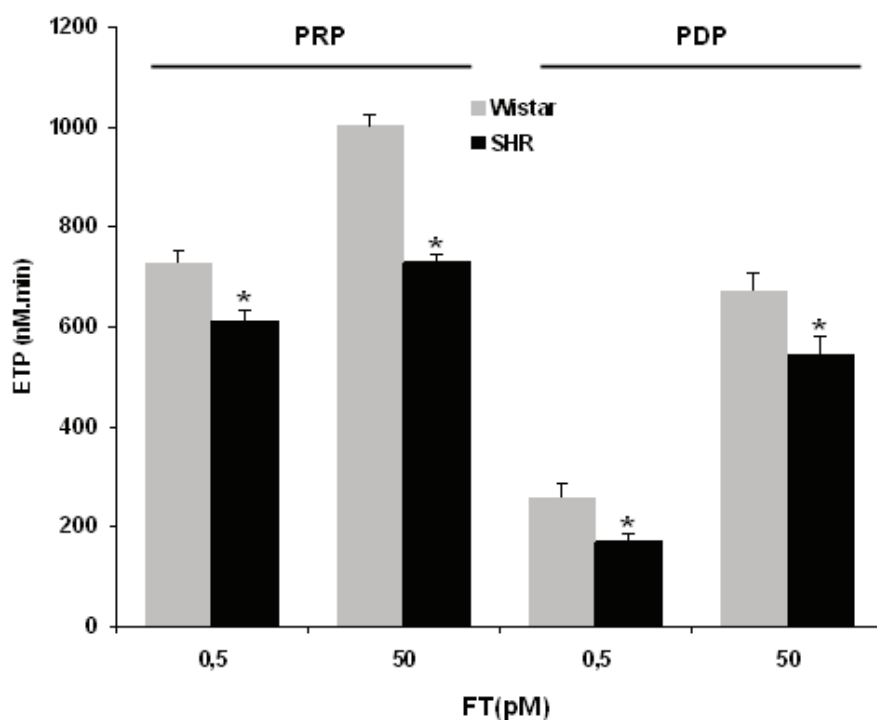


**Figure 18 A :** Courbes de génération de thrombine dans le PRP des rats SHR et Wistar, ajusté à 500G/L de plaquettes et en présence de 0,5 pM de FT.

L'initiation de la génération de thrombine est retardée et le pic de thrombine générée est plus faible dans le plasma du rat SHR par rapport au plasma du rat Wistar. Des quantités plus faibles de thrombine générée sont observées à la fois dans le PRP et le PDP des rats SHR, et ce quelle que soit la concentration de FT utilisée pour déclencher la coagulation (figure 18 B et figure 18 C). Comme attendu, à des concentrations faibles en FT, la génération de thrombine est plus élevée en présence de surfaces cellulaires (plaquettes) par rapport à des phospholipides synthétiques (mélange PC/ PS / PE).



**Figure 18 B :** Travail thrombinique réalisé dans le plasma riche en plaquettes (PRP) ajusté à 500 G /L en plaquettes ou en plasma dépourvu en plaquettes (PDP) additionné de 4  $\mu$ M vésicules PC /PS / PE. La coagulation est déclenchée soit avec de faibles concentrations (0,5 pM) ou hautes (50 pM) de facteur tissulaire (FT). Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  SEM de 8 à 13 différents plasmas testés; \* P < 0,05 versus Wistar, † P < 0,05 versus PRP à 0,5 pM de TF.



**Figure 18 C :** Travail thrombinique réalisé dans le plasma riche en plaquettes (PRP) ajusté à 500 G/L en plaquettes ou en plasma dépourvu en plaquettes (PDP) des rats âgés de 5 semaines. La coagulation est déclenchée soit avec de faibles concentrations (0,5 pM) ou hautes (50 pM) de facteur tissulaire (FT) additionné de 4  $\mu$ M vésicules PC /PS / PE dans le cas de PDP. Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  SEM de 6 à 11 différents plasmas testés; \* P < 0,05 versus Wistar.



Au niveau du PRP, nous avons observé un pic plus faible chez le rat SHR à 12 semaines quelle que soit la concentration de FT ajoutée par rapport au rat Wistar. Nous avons observé également un temps pour atteindre le pic significativement plus faible et une vélocité plus élevée chez ce rat à de faible concentration en FT (tableau VI).

**Tableau VI :** Paramètres thrombinographiques dans le PRP chez les rats à 12 semaines. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  SEM. n=10 pour chaque groupe, \*P<0,05

	FT 0,5 (pM)		FT 50 (PM)	
	Wistar	SHR	Wistar	SHR
<b>ETP (nM.min)</b>	812 $\pm$ 80	592 $\pm$ 39 *	933 $\pm$ 71	628 $\pm$ 27*
<b>Temps de latence (min)</b>	6,2 $\pm$ 0,4	6,6 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,1
<b>Pic (nM)</b>	163 $\pm$ 17	137 $\pm$ 11	161 $\pm$ 21	137 $\pm$ 9
<b>Temps pour atteindre le pic (min)</b>	10,3 $\pm$ 0,4	8,9 $\pm$ 0,3*	5,0 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,3
<b>Vélocité (nM/min)</b>	45 $\pm$ 6	74 $\pm$ 9*	58 $\pm$ 9	43 $\pm$ 4

Au niveau du PDP, un pic et une vélocité plus faibles sont observés chez le rat SHR à 12 semaines à de fortes concentrations en FT par rapport au Wistar. Aucune différence n'est observée dans le temps pour atteindre le pic (tableau VII).

**Tableau VII :** Paramètres thrombinographiques dans le PDP chez les rats à 12 semaines. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  SEM. n=10 pour chaque groupe, \*P<0,05

	FT 0,5 (pM)		FT 50 (pM)	
	Wistar	SHR	Wistar	SHR
<b>ETP (nM.min)</b>	521 $\pm$ 55	328 $\pm$ 24 *	902 $\pm$ 61	669 $\pm$ 47 *
<b>Temps de latence (min)</b>	3,8 $\pm$ 0,3	4,6 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1
<b>Pic (nM)</b>	59 $\pm$ 9	56 $\pm$ 5	207 $\pm$ 19	163 $\pm$ 18
<b>Temps pour atteindre le pic (min)</b>	8,1 $\pm$ 0,4	8,1 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,6
<b>Vélocité (nM/min)</b>	16 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2	105 $\pm$ 11	85 $\pm$ 9*

Cependant, nous n'avons pas observé de différences dans le temps de latence, que ce soit au niveau du PRP comme du PDP.

A 5 semaines, le PRP du rat SHR montre des valeurs de pic de thrombine générée et de vélocité plus faibles par rapport au rat Wistar. Cependant, aucune différence significative dans le temps de latence et le temps pour atteindre le pic n'est notée (tableau VIII) et ce, quelle que soit la concentration de FT utilisée pour déclencher la réaction.

**Tableau VIII:** Paramètres thrombinographiques dans le PRP des rats de 5 semaines. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  SEM. n=11 pour chaque groupe, \*P<0,05

PRP	FT (0,5 pM)		FT 50 (pM)	
	Wistar	SHR	Wistar	SHR
ETP (nM.min)	730 $\pm$ 19	612 $\pm$ 19*	1003 $\pm$ 19	731 $\pm$ 12*
Temps de latence (min)	8,0 $\pm$ 1,1	7,0 $\pm$ 1,1	7,0 $\pm$ 0,3	7,0 $\pm$ 0,7
Pic (nM)	146 $\pm$ 7	117 $\pm$ 7*	197 $\pm$ 10	139 $\pm$ 18*
Temps pour atteindre le pic (min)	12,0 $\pm$ 1,2	11,0 $\pm$ 1,5	10,0 $\pm$ 0,4	10,0 $\pm$ 1,0
Vélocité (nM/min)	49 $\pm$ 4	35 $\pm$ 3	69 $\pm$ 3	47 $\pm$ 7

Au niveau du PDP, le rat SHR de 5 semaines montre des valeurs de pic de thrombine générée plus faible par rapport au Wistar du même âge. Cependant, aucune différence n'est notée dans le temps de latence, le temps pour atteindre le pic et la vélocité entre ces rats de 5 semaines (tableau IX).

De plus, l'addition de fortes concentrations en FT (50 pM) réduit le temps de latence et le temps pour atteindre le pic et augmente les valeurs de vélocité dans le PDP des deux souches de rats (tableau IX).

**Tableau IX:** Paramètres thrombinographiques dans le PDP des rats de 5 semaines. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  SEM. n=11 pour chaque groupe, \*P<0,05

PDP	FT (0,5 pM)		FT 50 (pM)	
	Wistar	SHR	Wistar	SHR
ETP (nM.min)	257 $\pm$ 29	168 $\pm$ 17*	671 $\pm$ 38	542 $\pm$ 40*
Temps de latence (min)	8,0 $\pm$ 1,6	7,0 $\pm$ 1,7	3,0 $\pm$ 0,6	3 $\pm$ 0,7
Pic (nM)	54 $\pm$ 10	42 $\pm$ 10*	128 $\pm$ 12	107 $\pm$ 17*
Temps pour atteindre le pic (min)	11 $\pm$ 1,7	11 $\pm$ 1,8	5,0 $\pm$ 0,8	6,0 $\pm$ 1,0
Vélocité (nM/min)	18 $\pm$ 3	14 $\pm$ 4	60 $\pm$ 8	52 $\pm$ 11

### **II.1.2. Quantification des facteurs de coagulation dans le plasma**

Nous avons quantifié les facteurs de coagulation dans les plasmas des rats SHR et des rats Wistar à l'âge de 5 et 12 semaines et nous avons choisi parmi les facteurs de coagulation pro-coagulants : le TF, déclencheur de la voie extrinsèque de la coagulation et libéré par la paroi vasculaire ; la prothrombine, le précurseur de la thrombine ; le FVIII, cofacteur jouant un rôle clé dans l'amplification de la coagulation ; les complexes TAT, marqueur de coagulation intravasculaire. Et les facteurs anticoagulants, nous avons choisi: le TFPI, inhibiteur spécifique de la voie du TF (voie extrinsèque) et libéré par la paroi artérielle ; l'AT, l'inhibiteur spécifique de la thrombine ; Et la thrombomoduline, cofacteur du système inhibiteur de la PCa.

Les résultats représentés dans le tableau X montrent chez les rats SHR par rapport aux rats Wistar, à 5 semaines :

- i) Des taux plasmatiques en prothrombine significativement plus faibles et des taux en FT plus faibles ;
- ii) Une activité TFPI significativement plus élevée mais des taux plasmatiques en thrombomoduline plus faibles ;
- iii) Des taux plasmatiques en TAT plus élevés bien que la différence ne soit pas statistiquement significative ;
- iiii) Des niveaux similaires d'antithrombine et de FVIII ;

Et les résultats à 12 semaines, montrent:

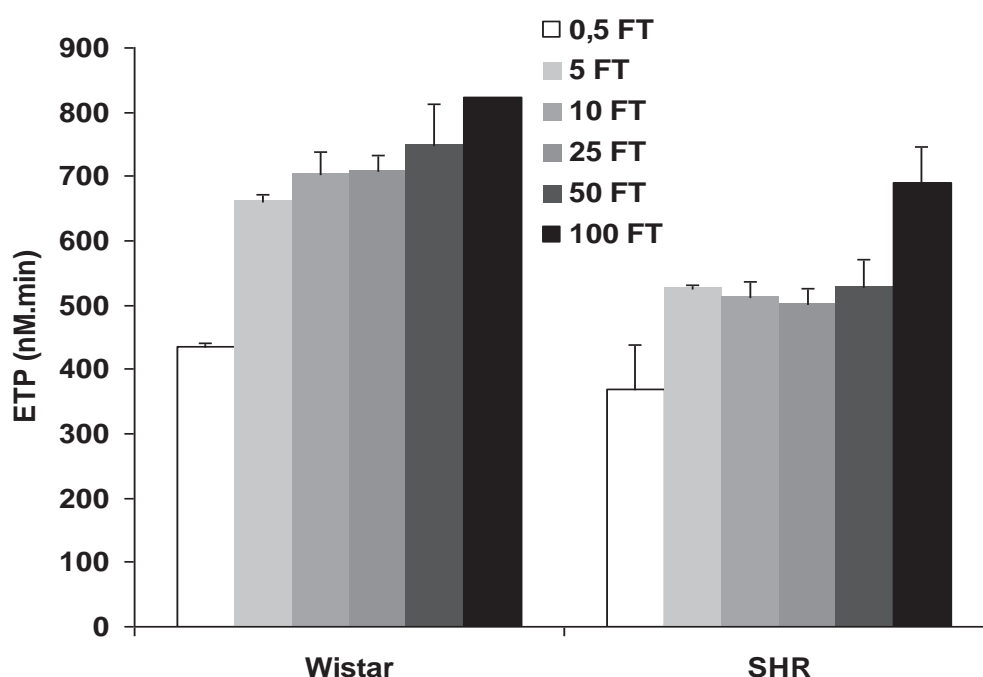
- i) Une activité FT et des taux plasmatiques en prothrombine significativement plus faibles ;
- ii) Des taux plasmatiques en FVIII plus faibles bien que la différence ne soit pas statistiquement significative ;
- iii) Une activité TFPI significativement plus élevée mais des taux plasmatiques en thrombomoduline plus faibles ;
- iiii) Des niveaux similaires d'antithrombine et de TAT.

**Tableau X:** Concentration des principaux facteurs pro et anticoagulants dans le plasma des rats SHR et rats Wistar à 5 et 12 semaines (sem). Résultats présentent les valeurs des moyennes  $\pm$  SEM ; \*  $P < 0,05$  versus Wistar.

Âge	Wistar		SHR	
	5 sem	12 sem	5 sem	12 sem
<b>FT (pmoles/L)</b>	11,9 $\pm$ 1,3	3,7 $\pm$ 0,8	9,7 $\pm$ 1,2	1,2 $\pm$ 0,3 *
<b>TFPI (U/mL)</b>	6,4 $\pm$ 0,5	4,5 $\pm$ 0,4	9,5 $\pm$ 0,8*	6,9 $\pm$ 0,2 *
<b>Prothrombine (%)</b>	65 $\pm$ 4	83 $\pm$ 4	55 $\pm$ 2*	58 $\pm$ 4 *
<b>Antithrombine (%)</b>	120 $\pm$ 5	107 $\pm$ 7	115 $\pm$ 5	100 $\pm$ 4
<b>Thrombomoduline (ng/mL)</b>	22,6 $\pm$ 2,2	28,9 $\pm$ 4,8	16,1 $\pm$ 1,3*	17,6 $\pm$ 2,3*
<b>FVIII (%)</b>	221 $\pm$ 21	150 $\pm$ 20	197 $\pm$ 33	120 $\pm$ 14
<b>Complexes TAT (ng/mL)</b>	12 $\pm$ 7	53 $\pm$ 12	33 $\pm$ 15	52 $\pm$ 10

### II.1.3. Effet du FT sur le taux de thrombine générée dans du plasma

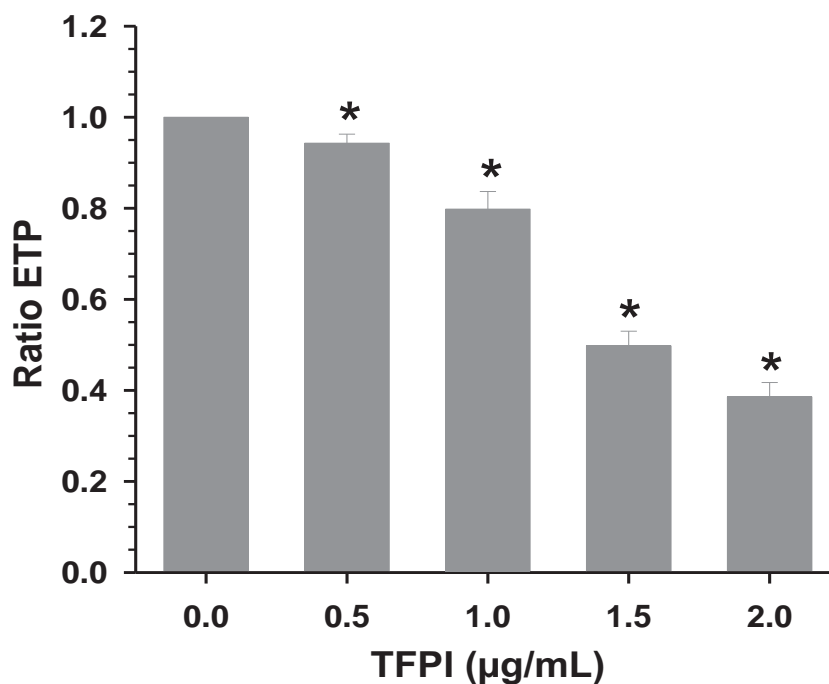
L'effet de concentrations croissantes en FT sur la génération de thrombine est mesuré dans le PDP des rats SHR et des rats Wistar. Les valeurs d'ETP, représentées dans la figure 19, montrent une augmentation à 5 pM de concentration en FT par rapport à 0,5 pM chez les deux souches de rat. Les valeurs d'ETP restent relativement constantes jusqu'à 50 pM de FT. A 100 pM, la génération de thrombine augmente plus considérablement chez le rat SHR. Quelle que soit la concentration de FT, le taux de thrombine générée dans le plasma des rats SHR reste inférieur à celui observé dans le plasma du rat Wistar.



**Figure 19 :** le travail thrombinique en fonction de la concentration de FT. La génération de thrombine est mesurée en présence de 0,5, 5, 10, 25, 50 ou 100 pM de FT dans le plasma dépourvu en plaquettes du rat SHR et du rat Wistar. Les résultats sont exprimés en moyenne d'ETP de 2 expériences en triple.

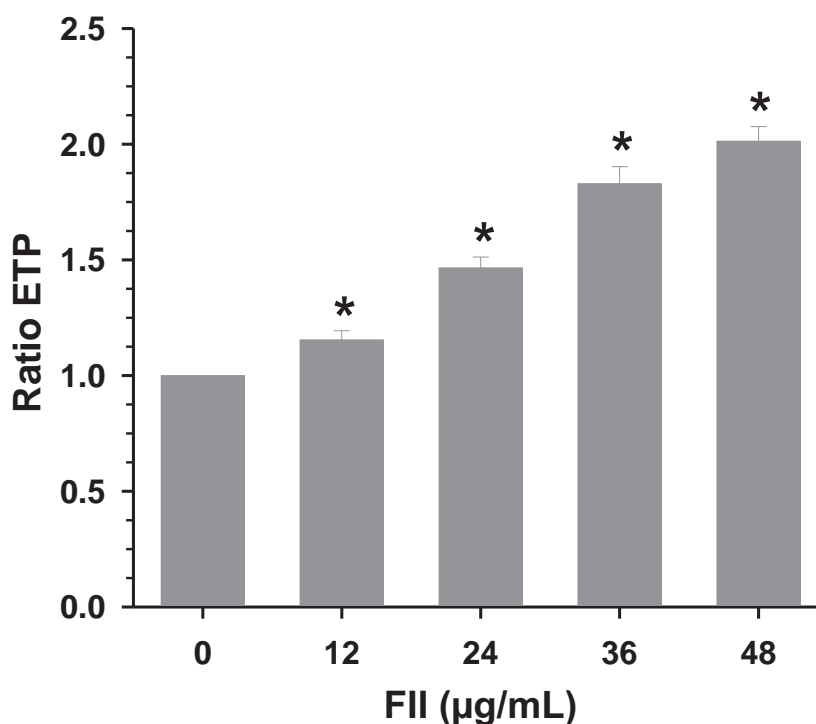
#### II.1.4. Effet de la prothrombine et du TFPI sur l'ETP *in vitro*

Afin de voir l'implication de la concentration en TFPI endogène dans la génération de thrombine dans le plasma, nous avons mesuré le travail thrombinique en présence de concentrations croissantes en TFPI recombinant humain purifié dans du PDP de rat Wistar. Les résultats présentés sur la figure 20 A montre que l'addition de TFPI induit une diminution dose-dépendante de l'ETP.



**Figure 20 A :** Effet de la concentration de TFPI sur génération de thrombine dans le plasma du rat Wistar. Du TFPI recombinant humain purifié a été ajouté à du PDP de rat Wistar et la génération de thrombine a été déclenchée par 0,5 pM de FT en présence de 4 µM de vésicules phospholipidiques PC /PS / PE. Les résultats (moyennes ± SEM de 5 expériences différentes avec le même pool de plasma) sont exprimés sous forme de ratios de valeurs obtenues avec chaque PDP seul. \* P < 0,05 vs une valeur de ratio de 1.

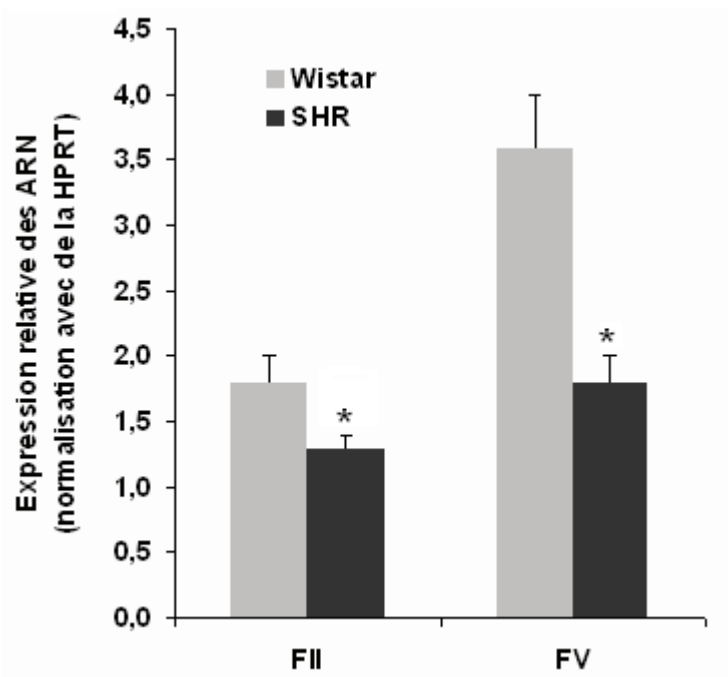
Nous avons ensuite mesuré l'effet de la prothrombine bovine purifiée en concentrations croissantes sur la génération de thrombine dans du PDP de rat SHR. La figure 20 B montre que l'addition de prothrombine induit une augmentation dose-dépendante de l'ETP.



**Figure 20 B :** Effet de la concentration de prothrombine sur le taux de thrombine générée dans le plasma du rat SHR. De la prothrombine bovine purifiée est ajoutée à du PDP de rat SHR, et la génération de thrombine est déclenchée par 0,5 pM de FT en présence de 4 µM de vésicules phospholipidiques PS / PE / PC. Les résultats (moyennes ± SEM de 5 expériences différentes du même pool de plasma) sont exprimés sous forme de ratios de valeurs obtenues avec chaque PDP seul. \* P < 0,05 vs une valeur de ratio de 1.

### II.1.5. Expression hépatique des facteurs de coagulation FII et FV chez le rat SHR

Nous avons vérifié l'état du foie par la quantification des expressions transcriptionnelles de deux facteurs de coagulation, la prothrombine et le FV chez les deux souches de rat. Le foie du rat SHR présente une expression plus faible en ARNm de prothrombine et FV par rapport au rat Wistar (Figure 21).



**Figure 21** : Expression des ARNm de la prothrombine et du facteur FV dans le foie. L'expression des ARNm est mesurée par le PCRq et l'expression relative est calculée par rapport à l'expression de la HPRT. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM d'au moins trois expériences indépendantes, \* $p < 0,05$  versus rats Wistar.

### II.1. 6. Conclusion :

Nous avons montré dans cette première partie de résultats que :

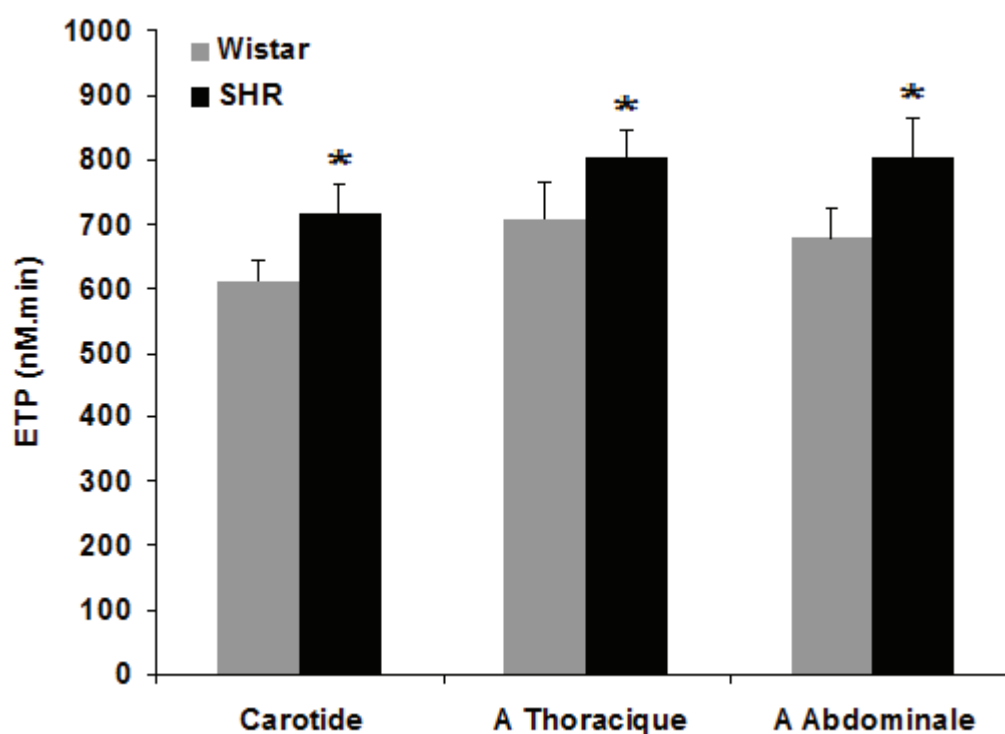
- Le plasma du rat SHR montre une génération de thrombine plus diminuée par rapport au rat Wistar.
- Ce résultat semble être lié, d'une part, aux faibles taux plasmatiques et d'expression hépatique en prothrombine, un facteur précurseur de la thrombine et de ce fait, jouant un rôle capital dans la génération de thrombine.
- D'autre part, les taux plasmatiques élevés en TFPI retrouvés chez le SHR par rapport au Wistar pouvaient également jouer un rôle dans cette faible génération de thrombine chez ce modèle de rat hypertendu. D'autant plus, *in vitro*, le TFPI influe sur la génération de thrombine dans le plasma.



## II.2. La coagulation au niveau pariétal

### II.2.1. Génération de thrombine à la surface d'anneaux artériels

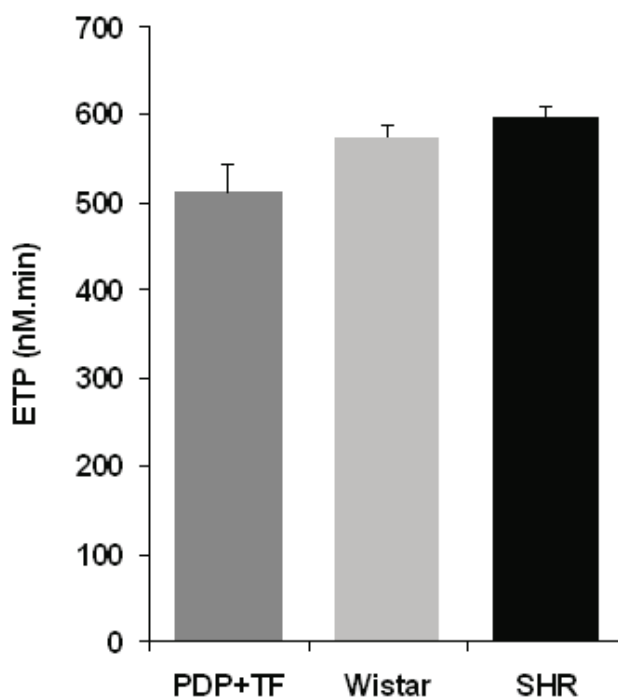
Nous avons mesuré la génération de thrombine à la surface d'anneaux artériels issus de carotides, d'aortes thoraciques ou d'aortes abdominales de rats SHR et Wistar. Les valeurs d'ETP obtenues montrent des quantités plus élevées de thrombine générée à la surface des anneaux issus de rats SHR par rapport aux anneaux des rats Wistar, et ce quelle que soit l'artère, carotide ou aorte. Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les anneaux carotidiens et aortiques (Figure 22).



**Figure 22** : Les valeurs d'ETP à la surface des anneaux artériels de carotide, aorte thoracique et abdominale. La réaction de génération de thrombine est déclenchée par l'addition des anneaux carotidiens ou aortiques à un pool de PDP de rats Wistar. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes des valeurs d'ETP obtenus. n=5 dans chaque groupe \* P<0,05 versus rats Wistar.

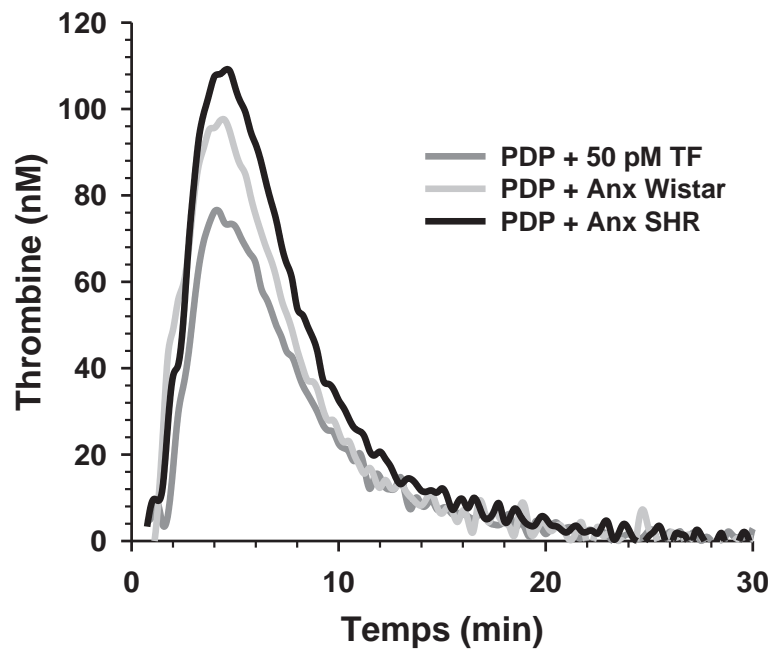
### II.2.2. Génération de thrombine à la surface d'anneaux aortiques

A l'issu de ce résultat, nous avons choisi de limiter notre étude comparative aux anneaux issus de l'aorte thoracique des animaux étudiés qui présente une facilité de prélèvement et une taille plus importante en nombre d'anneaux obtenu. Nous avons alors remesuré la génération de thrombine à la surface de la paroi aortique de ces rats SHR et des rats Wistar à l'âge de 5 et de 12 semaines.

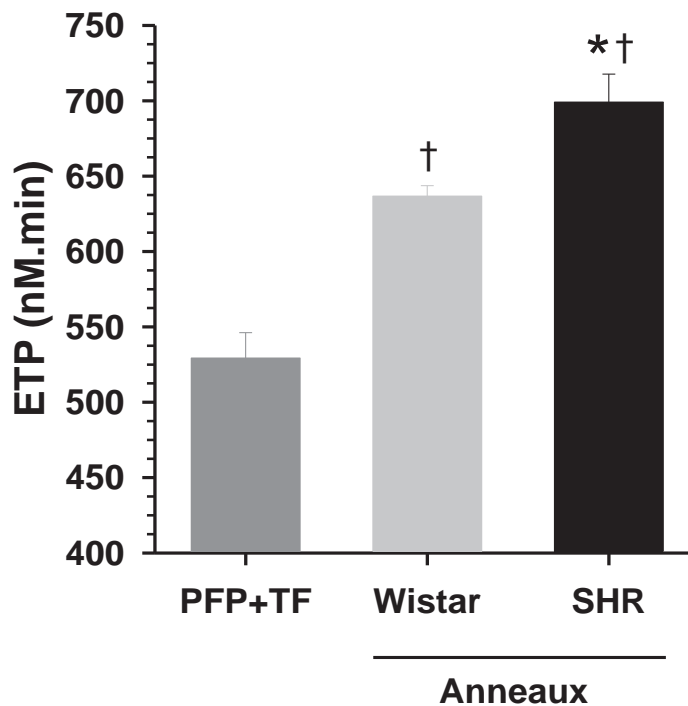


**Figure 23 A:** Travail thrombinique à la surface des anneaux aortiques des rats de 5 semaines. La réaction est déclenchée avec 50 pM de FT au niveau du PDP ou avec des anneaux des aortes thoraciques de rat SHR ou Wistar. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de 8 expériences avec des anneaux de rats différents.

Alors qu'aucune différence significative n'est observée à 5 semaines (figure 23 A), l'ajout des anneaux aortiques à un pool de PDP de rats Wistar a augmenté de manière significative les valeurs ETP par rapport au plasma seul stimulé par 50 pM de FT (une concentration choisie pour être proche des quantités de FT de libérées par les anneaux) chez les rats à 12 semaines. Cette activité procoagulante est encore plus élevée pour les anneaux aortiques des rats SHR de 12 semaines que pour les anneaux Wistar (figures 23 B et 23 C), comme c'était également observé dans la figure 22. L'analyse des courbes de la cinétique de la formation de thrombine a révélé une différence marquée dans la hauteur du pic entre les différents spécimens alors qu'il n'y a pas de différence significative dans le temps de latence (figure 22 B).



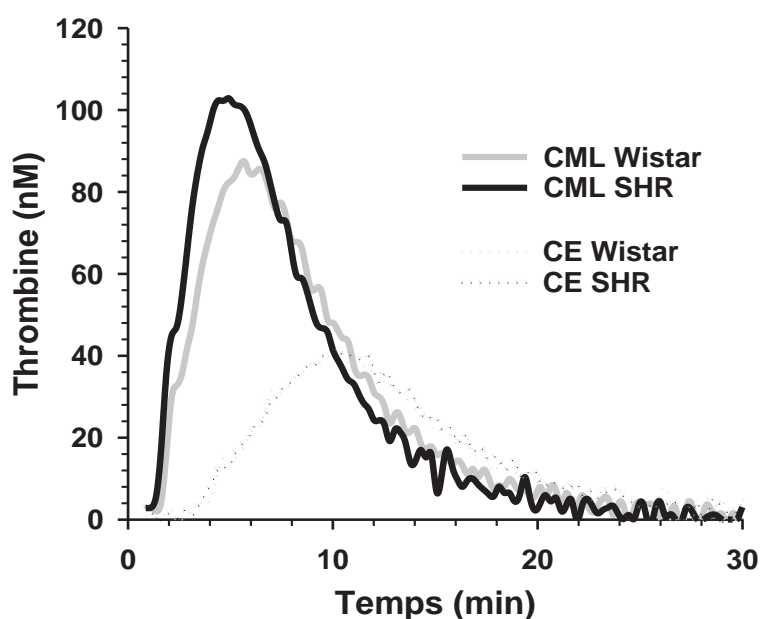
**Figure 23 B:** Courbes de génération de thrombine à la surface des anneaux aortiques. La réaction est déclenchée avec 50 pM de FT au niveau du PDP ou avec des anneaux des aortes thoraciques de rat SHR ou Wistar.



**Figure 23 C:** Travail thrombinique à la surface des anneaux aortiques des rats de 12 semaines. La réaction est déclenchée avec 50 pM de FT au niveau du PDP ou avec des anneaux des aortes thoraciques de rat SHR ou Wistar. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM de 8 expériences avec des anneaux de rats différents; \* P < 0,05 vs Wistar; # P < 0,05 vs PDP + TF.

### II.2.3. Génération de thrombine à la surface des CE et des CML vasculaires des rats de 12 semaines

Nous avons étudié la génération de thrombine à la surface des principales cellules constituant la paroi aortique, les CE et les CML vasculaires. Les résultats montrent une génération plus prononcée en thrombine à la surface des CML par rapport aux CE que ce soit chez le rat SHR ou chez le rat Wistar (figures 24) avec des temps de latence et pour atteindre le pic, plus élevés et un pic de thrombine générée plus faible avec les CE par rapport aux CML (tableau XI).



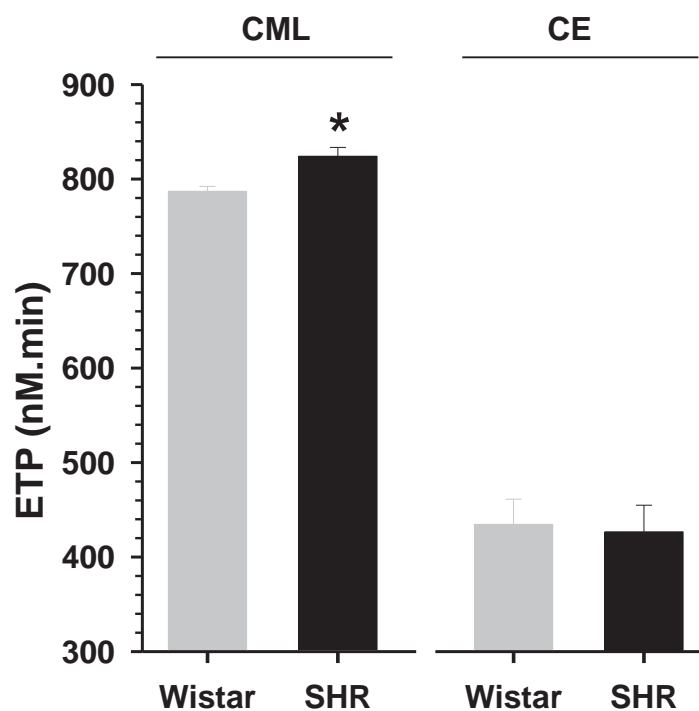
**Figure 24 A :** Courbes représentatives de génération de thrombine à la surface des CE et CML vasculaires adhérentes dans un pool PDP de rats Wistar ajouté à une monocouche de CE ou de CML en culture primaire. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de 12 expériences.

**Tableau XI :** Paramètres thrombinographiques de la génération de thrombine à la surface des CE et les CML.

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  SEM (n=3).

	CE		CML	
	Wistar	SHR	Wistar	SHR
<b>ETP (nM.min)</b>	435 $\pm$ 27	427 $\pm$ 28	787 $\pm$ 5	824 $\pm$ 9 *
<b>Temps de latence (min)</b>	4 $\pm$ 0,3	4 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 0,2	2 $\pm$ 0,3
<b>Pic (nM)</b>	38 $\pm$ 3	38 $\pm$ 6	43 $\pm$ 5	72 $\pm$ 7 *
<b>Temps pour atteindre le pic (min)</b>	10 $\pm$ 0,3	11 $\pm$ 0,6	7 $\pm$ 0,7	6 $\pm$ 0,8
<b>Vélocité (nM/min)</b>	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	16 $\pm$ 4	17 $\pm$ 4

Les résultats montrent également des quantités de thrombine générée plus élevées à la surface des CML issues des rats SHR par rapport aux rats Wistar, mais aucune différence n'est observée entre les CE des deux souches de rat (Figure 24 B). Cette différence est d'autant plus observée dans les valeurs des pics de thrombine générée et qui se trouvent être plus élevés chez les CML du rat SHR par rapport au rat Wistar.

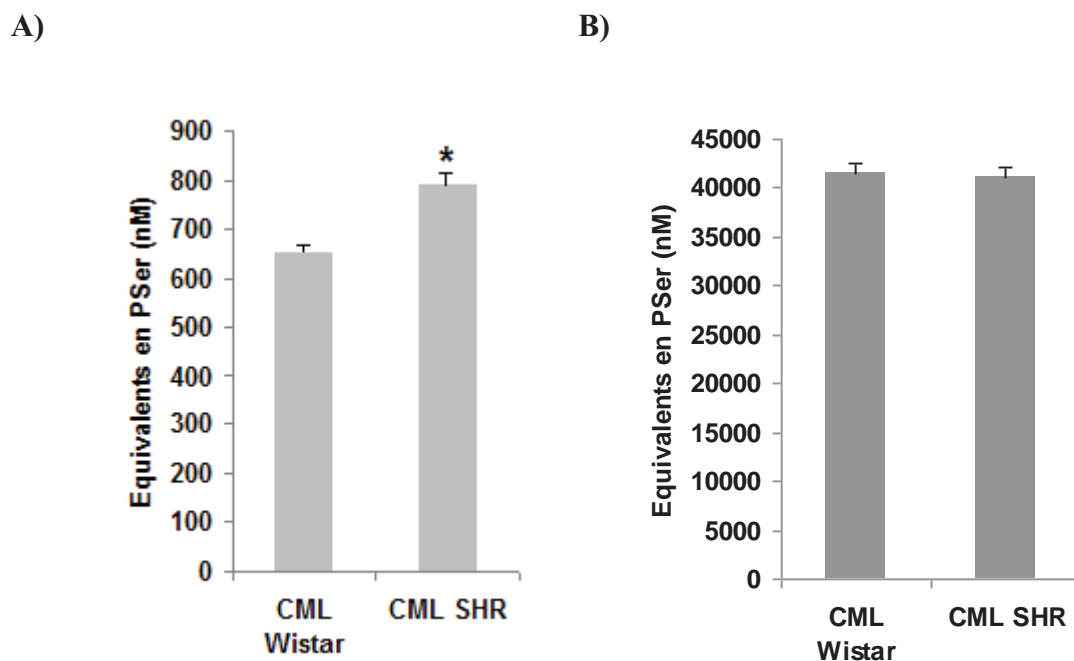


**Figure 24 B :** Valeurs d'ETP de la génération de thrombine à la surface des CE et CML vasculaires adhérentes. La génération de thrombine est réalisée dans un pool de PDP de rats Wistar ajouté à une monocouche de CE ou de CML en culture primaire. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de 12 expériences; \*  $P < 0,05$  vs Wistar.

### II.2.3.1. Effet du détachement des cellules par la trypsine sur l'activité procoagulante

Nous avons étudié l'effet du détachement des CML de rat SHR et de rat Wistar de leur support par la trypsine sur l'activité PPA de ces cellules en comparant cette activité procoagulante des CML du rat SHR et du rat Wistar détachées par la trypsine à celle de cellules adhérentes après les avoir ajustées au même nombre (20000 cellules). La Figure 25 A montre les résultats obtenus avec les CML adhérentes et la figure 25 B présente les résultats obtenus avec les CML détachées des deux souches de rat. Une différence significative existe entre les CML de rat Wistar et celle du rat SHR chez qui l'activité PPA est significativement plus élevée quand les cellules sont adhérentes, par contre, aucune différence n'est observée quand les cellules sont détachées à la trypsine.

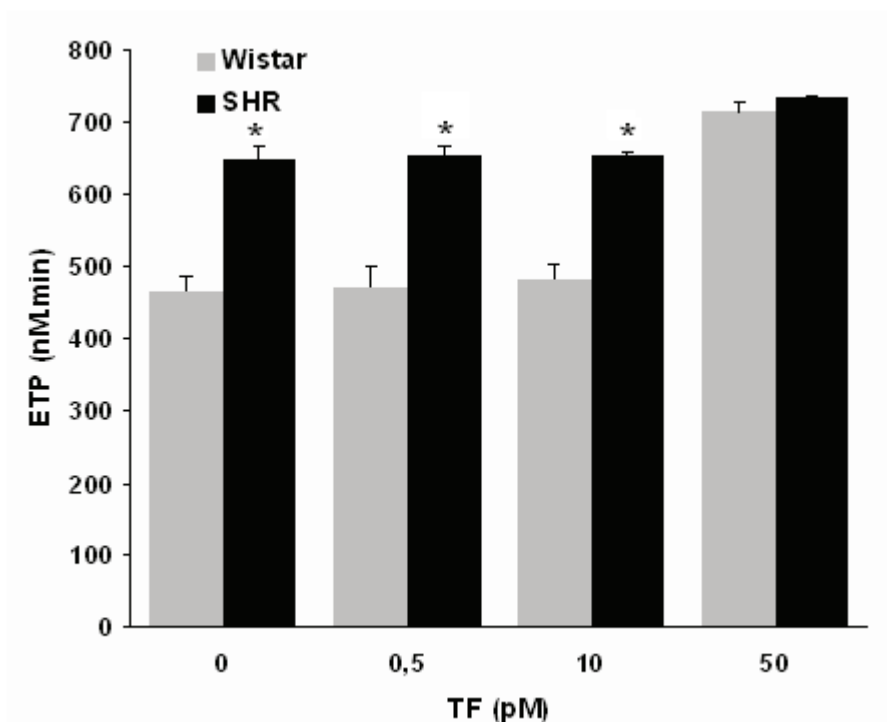
Par ailleurs, les cellules détachées par la trypsine présentent une activité procoagulante 50 fois plus élevée qu'avec les cellules adhérentes (figure 24 A et B).



**Figure 25 :** Effet du détachement des CML de rats SHR et Wistar par la trypsine sur leur activité PPA. A) Activité PPA à la surface des CML adhérentes. B) Activité PPA à la surface des CML détachées par la trypsine. Les cellules sont ajustées au même nombre de 20000 cellules. Les résultats sont exprimés en équivalents PSer (n=6 pour les cellules adhérentes et n=8 pour les cellules détachées). \* p=0,003 versus CML Wistar.

### II.2.3.2. Effet de la concentration en FT sur la génération de thrombine à la surface des CML

L'effet de concentrations croissantes en FT sur la génération de thrombine est mesuré à la surface des CML des rats SHR et des rats Wistar. Le calcul des ETP des courbes de cinétique de génération de thrombine (Figure 26) montre des valeurs équivalentes relativement constantes d'ETP obtenues avec des concentrations allant de 0 à 10 pM en FT par chez les deux souches de rat. A 50 pM de FT, une augmentation de travail thrombinique est enregistrée à la surface des CML des deux souches de rat par rapport aux valeurs obtenues avec les concentrations inférieures. Cependant, quelle que soit la concentration de FT utilisée pour déclencher la génération de thrombine, un taux de thrombine génération plus élevé est observé à la surface des CML SHR par rapport aux CML du rat Wistar, sauf à 50 pM où des taux similaires sont obtenus pour les deux souches de rat.



**Figure 26 :** Valeurs d'ETP à la surface des CML de rat SHR et Wistar en fonction de la concentration de TF. Les résultats sont des valeurs moyennes d'ETP de 3 expériences différentes avec des cellules au passage 6. \* $p < 0,05$  versus CML Wistar.

### II.2.3.3. Effet de la PCa et du TFPI sur les paramètres thrombinographiques à la surface des CML.

Nous avons étudié l'effet de deux inhibiteurs de la génération de thrombine sur les paramètres thrombinographiques des CML, à savoir la PCa (25 nM) et le TFPI (10 ng/mL). Les résultats présentés dans le tableau X montrent une diminution significative des valeurs d'ETP après ajout de la PCa et du TFPI avec une diminution des valeurs du pic chez les deux souches de rat. Cependant, aucune modification n'est observée dans les valeurs du temps de latence, du temps pour atteindre le pic et de la vélocité chez les deux souches de rat (tableauXII).

**Tableau XII :** Paramètres thrombinographiques de la génération de thrombine à la surface des CML en présence de PCa et de TFPI.

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  SEM (n=4) ; \*p<0,05 versus Wistar.

	Base		PCa		TFPI	
	Wistar	SHR	Wistar	SHR	Wistar	SHR
<b>ETP (nM.min)</b>	787 $\pm$ 5	824 $\pm$ 9 *	599 $\pm$ 63	577 $\pm$ 63	619 $\pm$ 55	638 $\pm$ 64
<b>Temps de latence (min)</b>	2,0 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,3
<b>Pic (nM)</b>	43 $\pm$ 5	72 $\pm$ 7 *	55 $\pm$ 12	62 $\pm$ 7	53 $\pm$ 6	63 $\pm$ 9
<b>Temps pour atteindre le pic (min)</b>	7,0 $\pm$ 0,7	6,0 $\pm$ 0,8	6,8 $\pm$ 0,4	5,8 $\pm$ 0,4	7,7 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,7
<b>Vélocité (nM/min)</b>	16 $\pm$ 4	17 $\pm$ 4	14 $\pm$ 4	18 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	16 $\pm$ 3



### II.2.4. Dosage des facteurs hémostatiques pariétaux

Nous avons comparé les quantités des principaux facteurs pro et anticoagulants d'origine pariétale exprimés à la surface des anneaux aortiques, des CML et des CE des rats SHR et des rats Wistar et qui jouent un rôle clé dans l'activation ou l'inhibition de la voie extrinsèque de la coagulation. A la surface des anneaux aortiques, le rat SHR exprime des quantités significativement plus élevées en TFPI mais également plus élevées en activité PPA que le rat Wistar. Cependant, bien que non significatives, des quantités plus faibles en FT sont libérées par les anneaux du rat SHR par rapport au rat Wistar.

Ceci n'est pas observé au niveau cellulaire des CML du rat SHR qui expriment plus de FT. De plus grandes quantités de PPA et de TFPI sont également observées chez ces CML contrairement aux CML de rat Wistar.

Aucune différence n'est retrouvée dans les quantités de FT et de TFPI libérées par les CE des deux souches de rat (Tableau XIII).

**Tableau XIII:** Quantité des facteurs pro- et anticoagulants exprimés à la surface des anneaux aortiques et des cellules vasculaires issus des rats SHR et rats Wistar.

Spécimen	Facteur	Wistar	SHR
<i>Anneaux aortiques</i>	TF (pmoles/L)	93 ± 8	76 ± 9
	TFPI (U/mL)	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,01 *
	PPA (nM équivalent PS/g d'anneau)	1,9 ± 0,2	3,4 ± 0,4 *
<i>CML aortiques</i>	TF (pmoles/L)	29 ± 2	37 ± 2 *
	TFPI (U/mL)	0,009 ± 0,002	0,038 ± 0,004 *
	PPA (nM équivalent PS / mL)	649 ± 22	747 ± 33 *
<i>CE aortiques</i>	TF (pmoles/L)	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,5
	TFPI (U/mL)	0,020 ± 0,002	0,020 ± 0,001

### **II.3. Conclusion :**

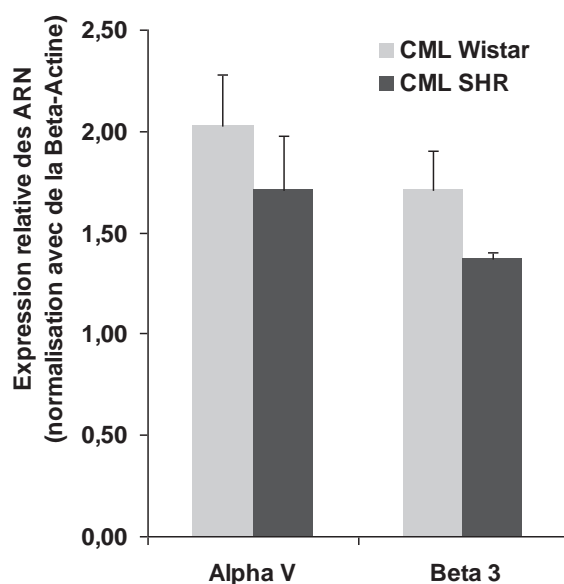
Nous avons montré dans cette deuxième partie des résultats que :

- Le rat SHR montre une génération de thrombine beaucoup plus élevée à la surface des anneaux artériels par rapport au rat Wistar. Ce résultat est lié principalement l'activité procoagulante élevée quantifiée à la surface des anneaux aortiques de ces rats.
  
- Les cellules responsables de cette hypercoagulabilité pariétale sont les CML et pas les CE.
  
- Les CML aortiques du rat SHR présentent une génération de thrombine plus augmentée par rapport aux CML du rat Wistar. Ce résultat est expliqué principalement par l'augmentation de l'activité procoagulante et les taux élevés de TF quantifiés à la surface de ces cellules.

### III. Interaction coagulation et remodelage vasculaire

#### III.1. Expression des récepteurs de la thrombine par les CML vasculaires

Nous avons également étudié l'expression des intégrines  $\alpha v$  et  $\beta 3$  par les CML des rats SHR et des rats Wistar par PCRq. Les résultats représentés dans la figure 27, montrent un taux d'expression des ARNm des deux intégrines plus faible au niveau des CML du rat SHR par rapport au Wistar.

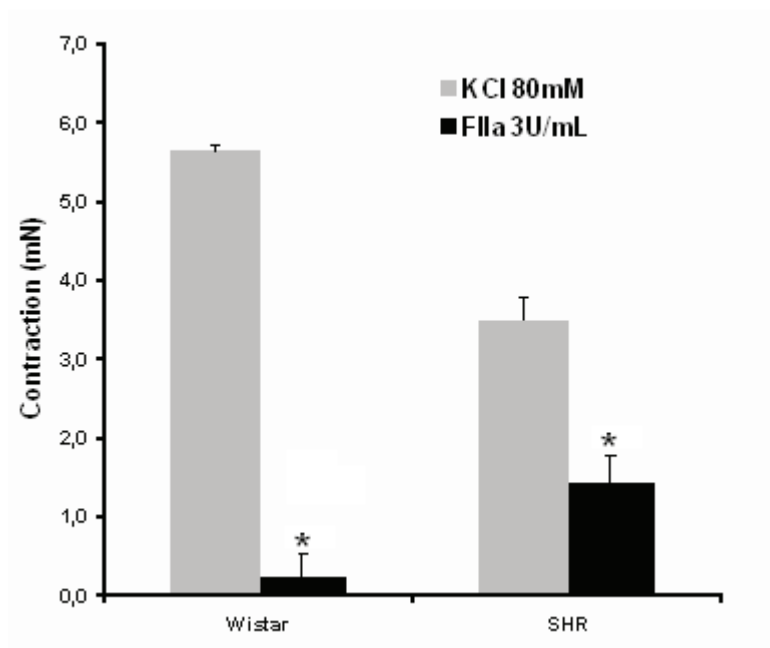


**Figure 27 :** Expression des ARNm des intégrines  $\alpha v$  et  $\beta 3$  dans les CML.

L'expression des sous-unités  $\alpha v$  et  $\beta 3$  des intégrines est mesurée par PCRq. Les cellules sont cultivées jusqu'au passage 5 et l'expression relative des intégrines est calculée par rapport à l'expression de la  $\beta$  actine. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

### III.2. Effet de la thrombine sur la réactivité vasculaire

L'effet de la thrombine sur la fonction vasculaire de la carotide a été exploré *in vitro* avec la méthode de myographie. Les résultats montrent que la thrombine induit une contraction chez les anneaux carotidiens du rat SHR contrairement au rat Wistar alors que l'effet contractile est moins présent chez ces rats avec le KCl 80 mM (Figure 28).



**Figure 28 :** Réponses contractiles de la carotide de rat SHR et Wistar au KCl et FII.

### III.3. Etude du rôle des CML dans la rigidité artérielle

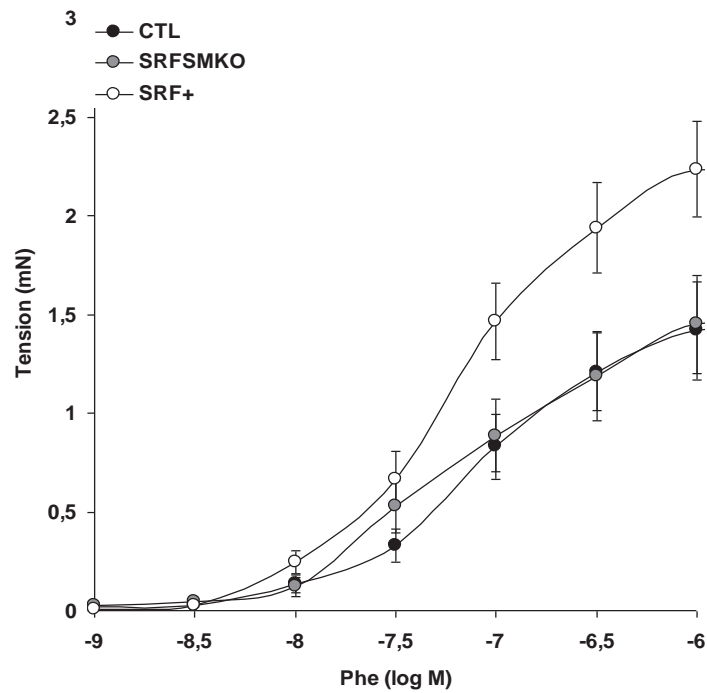
#### III.3.1. Au niveau de l'artère carotide

La fonction vasculaire de la carotide des souris KO en SRF, SRF<sup>SMKO</sup>, et avec surexpression en SRF, SRF<sup>+</sup> et contrôles, a été explorée *in vitro* avec la méthode de myographie. Les résultats sont présentés dans le tableau XIV et les figures 29.

**Tableau XIV:** Les réponses contractiles et de relaxation des carotides de souris contrôle, SRFSMKO et SRF<sup>+</sup>. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. + LN, préparations carotidiennes préincubées avec  $10^{-4}$  M de L-NAME, Emax, une efficacité maximale; pD2, concentration requise pour produire une contraction de 50% en réponse à PE ou concentration requise pour produire la relaxation de 50% en réponse à l'ACh et le SNP. \* P <0,05, \*\*\* p <0,001 vs groupe contrôle mutant. ° P <0,05, ∞P <0,01, SRF + vs SRFSMKO.

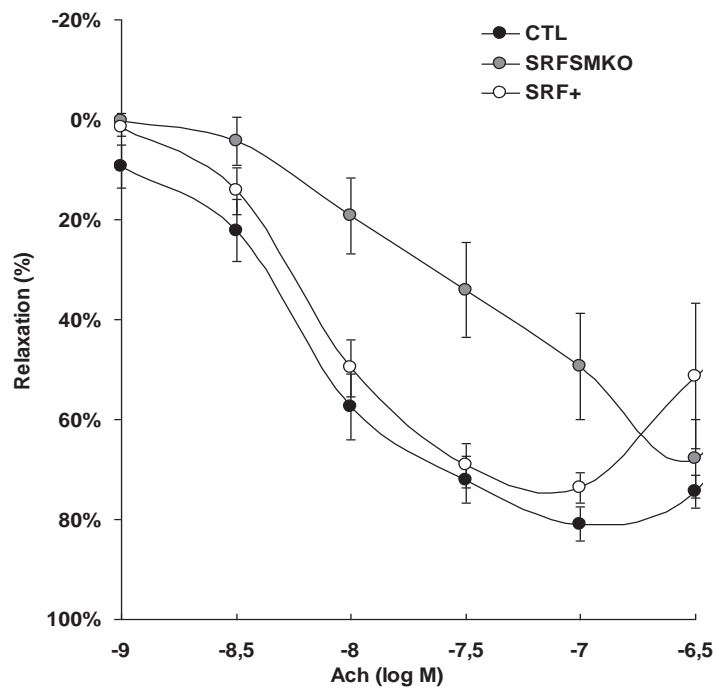
		Contrôle	SRF <sup>SMKO</sup>	SRF <sup>+</sup>
PE	n	11	7	8
	Emax (mN)	1,75 $\pm$ 0,30	1,68 $\pm$ 0,31	<b>2,61 <math>\pm</math> 0,25*°</b>
	pD2	-6,81 $\pm$ 0,07	-6,98 $\pm$ 0,08	-7,00 $\pm$ 0,11
ACh	n	11	7	8
	Emax (%)	84 $\pm$ 3	80 $\pm$ 7	83 $\pm$ 4
	pD2	-8,19 $\pm$ 0,10	<b>-7,36 <math>\pm</math> 0,20***</b>	<b>-8,00 <math>\pm</math> 0,08<sup>∞</sup></b>
SNP	n	11 (+LN)	7 (+LN)	8 (+LN)
	Emax (%)	112 $\pm$ 5	106 $\pm$ 3	116 $\pm$ 7
	pD2	-7,82 $\pm$ 0,14	<b>-7,25 <math>\pm</math> 0,15*</b>	-7,75 $\pm$ 0,07

Un effet contractile plus important est observé chez les souris surexprimant SRF (SRF<sup>+</sup>) par rapport aux contrôles et au SRF<sup>SMKO</sup> (Figure 29A). Ceci est quantifié par un effet maximal significativement plus élevé (tableau XIV). Aucune différence n'est cependant notée au niveau de la contraction à la PE chez les souris KO par rapport aux contrôles.



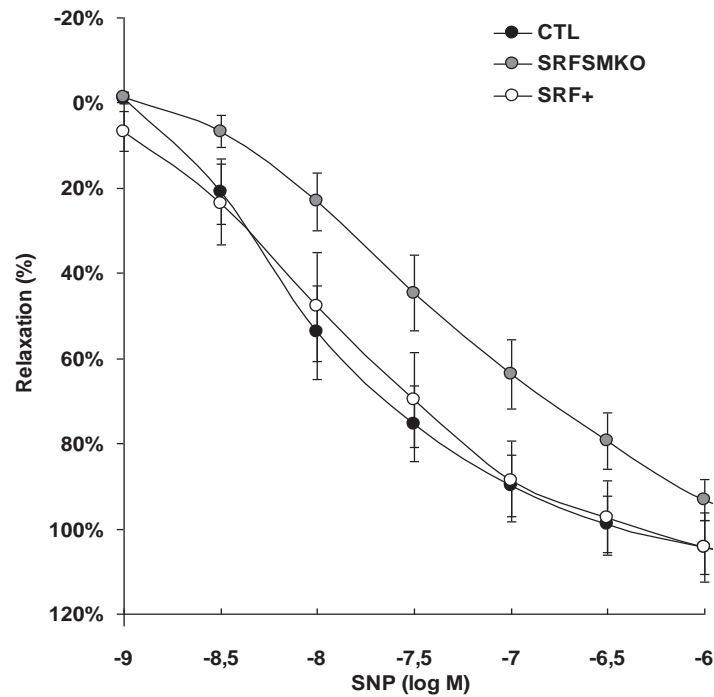
**Figure 29 A :** Courbes doses réponses à la Phe dans la carotide de souris contrôle, SRF<sup>SMKO</sup> et SRF<sup>+</sup>.

La carotide des souris SRF<sup>+</sup> présente une relaxation significativement plus faible que les souris SRF<sup>SMKO</sup> (figure 29 B), comme le montrent plus clairement les valeurs de pD<sub>2</sub> déduites des EC<sub>50</sub> des courbes dose réponses à l'Ach malgré un effet maximal similaires pour les trois groupes d'animaux (Tableau XIV).



**Figure 29 B :** Courbes doses réponses à l'Ach dans la carotide de souris contrôle, SRF<sup>SMKO</sup> et SRF<sup>+</sup>.

Après inhibition de la fonction endothéliale par le L-NAME, les valeurs d'effet maximal à la relaxation au SNP restent inchangé chez les trois groupes d'animaux. Cependant, le calcul de pD<sub>2</sub> à partir des EC<sub>50</sub> des courbes doses réponses au SNP, montrent des valeurs significativement plus élevée chez les souris mutantes SRF<sup>SMKO</sup> par rapport aux contrôles.



**Figure 29 C** : Courbes doses-réponses au SNP dans la carotide de souris contrôle, SRF<sup>SMKO</sup> et SRF<sup>+</sup>

### III.3.2. Au niveau de l'artère mésentérique

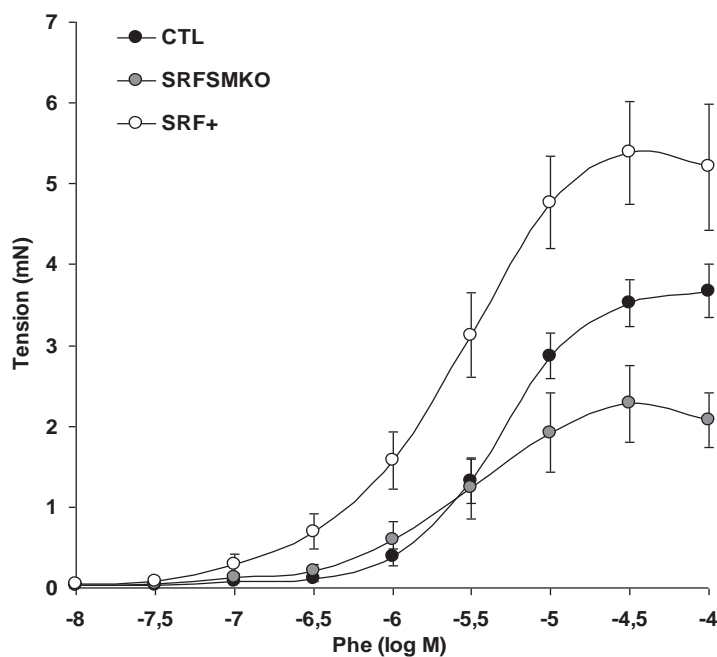
La fonction vasculaire de la mésentère des souris  $SRF^{SMKO}$ ,  $SRF^+$  et contrôles, a été également explorée *in vitro* avec la méthode de myographie. Les résultats sont représentés dans le tableau XV et les figures 30.

**Tableau XV:** Les réponses de contraction et de relaxation dans les artères mésentériques des souris contrôles,  $SRF^{SMKO}$  et  $SRF^+$ . Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM., n, le nombre de MA; + LN, les anneaux préincubés avec  $10^{-4}$  M de NAME,  $E_{max}$ , l'efficacité maximale;  $pD2$ , concentration requise pour produire une contraction de 50% en réponse à PE ou concentration requise pour produire une relaxation de 50% en réponse à l'ACh et le SNP. \*  $P < 0,05$ , mutant vs groupe témoin.  $\infty P < 0,01$ ,  $SRF^+$  vs  $SRF^{SMKO}$ .

		Contrôle	$SRF^{SMKO}$	$SRF^+$
PE	n	8	6	9
	$E_{max}$ (mN)	$3,82 \pm 0,34$	<b><math>2,37 \pm 0,48^*</math></b>	<b><math>5,70 \pm 0,65^{*\infty}</math></b>
	$pD2$	$-5,31 \pm 0,05$	$-5,48 \pm 0,12$	<b><math>-5,58 \pm 0,08^*</math></b>
ACh	n	10	7	9
	$E_{max}$ (%)	$82 \pm 4$	$84 \pm 5$	$88 \pm 4$
	$pD2$	$-6,79 \pm 0,17$	$-6,97 \pm 0,23$	$-6,94 \pm 0,15$
SNP	n	8 (+LN)	5 (+LN)	9 (+LN)
	$E_{max}$ (%)	$102 \pm 2$	$101 \pm 2$	$99 \pm 1$
	$pD2$	$-7,80 \pm 0,14$	$-7,83 \pm 0,25$	$-7,62 \pm 0,27$

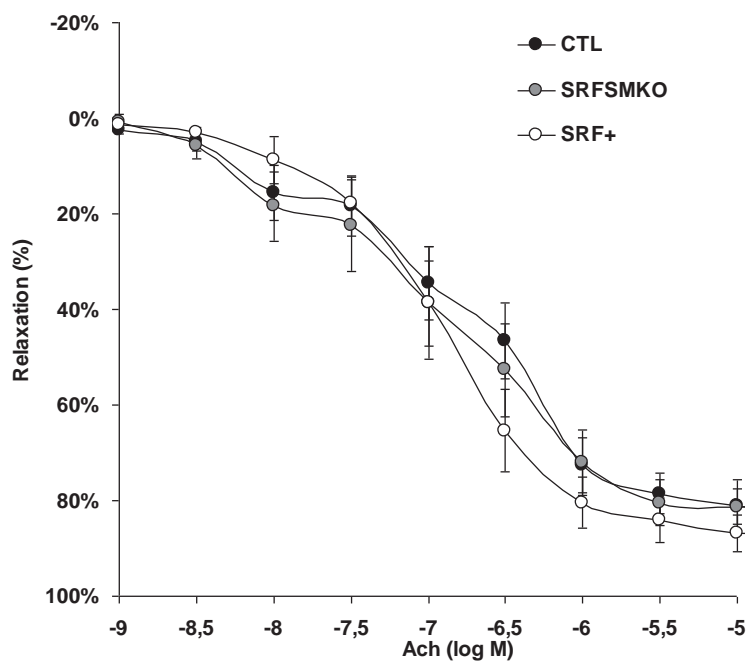
Un effet contractile plus important est observé chez les souris  $SRF^+$  par rapport aux contrôles et aux  $SRF^{SMKO}$ . Ces dernières présentent elles mêmes une contraction à la PE moins élevée que les contrôles (Figure 30A). Ceci est quantifié par l'effet maximal qui est calculé à partir des valeurs moyennes des tensions enregistrées pour chaque concentration de PE ajoutée, et qui se trouve être significativement plus élevé (tableau XV) chez les souris mutantes par rapport aux contrôles. Les valeurs de  $pD2$  confirment également que les souris  $SRF^+$  enregistrent une contraction à la PE plus élevée par rapports aux contrôles et aux souris KO (Tableau XV).



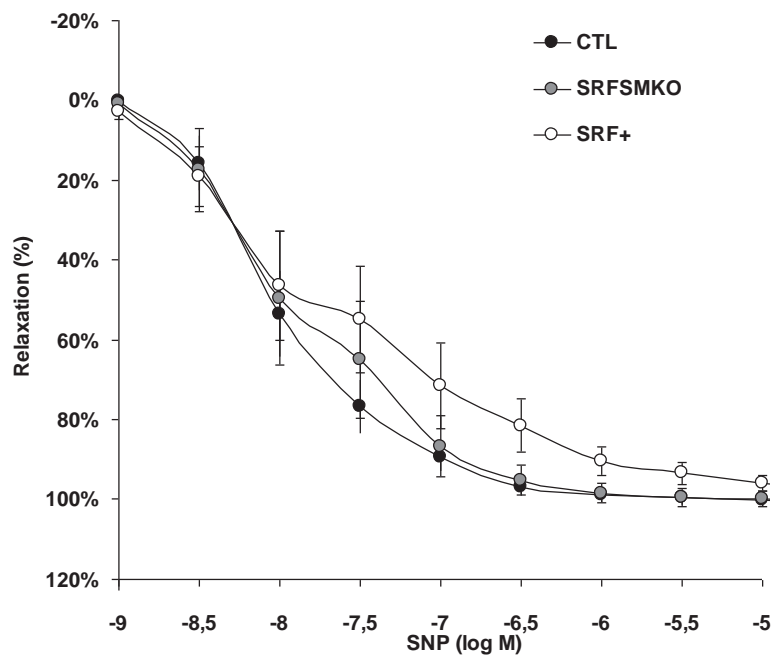


**Figure 30 A :** Courbes doses réponses à la PE dans la mésentère de souris contrôlé, SRF<sup>SMKO</sup> et SRF<sup>+</sup>.

L'effet relaxant au niveau de la mésentère reste inchangé chez les trois groupes d'animaux, et ceci que ce soit en présence de l'endothélium avec l'Ach (Figure 30 B) ou en absence de l'endothélium (par ajout de L-NAME) avec du SNP (Figure 30 C).



**Figure 30 B :** Courbes doses réponses à l'Ach dans la mésentère de souris contrôlé, SRF<sup>SMKO</sup> et SRF<sup>+</sup>.



**Figure 30 C** : Courbes doses réponses au SNP dans la mésentère de souris contrôle, SRF<sup>SMKO</sup> et SRF<sup>+</sup>

#### III.4. Conclusion :

La dernière partie de nos résultats montre :

- Une implication de la thrombine dans le tonus vasculaire des rats SHR. La thrombine génère un effet contractile sur les CML du rat SHR par rapport au rat Wistar.
- Les variations d'expression du facteur de transcription SRF dans la carotide altèrent à la fois la contraction et la relaxation au niveau des CMLs.
- Dans les artères de résistance (artère mésentérique), ces variations d'expression altèrent uniquement la relaxation (réponse à la PHE).

*Discussion*



Très peu d'études se sont intéressées à l'exploration de la coagulation chez le rat SHR, alors que l'hypertension artérielle est souvent associée à des événements thrombo-emboliques. Notre étude de la coagulation au niveau du plasma de ce rat a bien démontré une faible génération de thrombine dans le plasma du rat SHR par rapport au rat normotendu Wistar, qui est liée à une diminution du taux de prothrombine et une augmentation de la quantité de TFPI. Ce résultat contraste avec les taux élevés en thrombine générée à la surface de la paroi aortique qui peut être expliqué par une plus grande activité procoagulante des CML vasculaires.

La coagulation a longtemps été étudiée dans le plasma par le dosage des marqueurs plasmatiques d'activation de la coagulation *in vivo*. Plus récemment, l'étude de la réactivité du système de coagulation a été proposée. Celle-ci peut être évaluée par la quantité de thrombine formée *in vitro* en réponse à un stimulus défini, tandis que le premier reflète la génération de thrombine *in vivo* et dépend à la fois de la réactivité et des déclencheurs intermittents d'intensité variable. C'est une des raisons pour lesquelles la mesure de la génération de thrombine *in vitro* peut se révéler plus fiable que les marqueurs *in vivo*.

Alors que des niveaux élevés en complexe TAT avaient déjà été observés dans le plasma du rat SHR (Sawada et al. 2003) mais pas chez le rat SHR-SP (Abumiya et al. 2000) par rapport au plasma du rat Wistar-Kyoto, nos résultats actuels ont démontré un taux de TAT similaire chez les rats SHR par rapport aux rats Wistar même. Ces données sont en accord avec une hyporéactivité du système de coagulation chez les SHR comme le montre la mesure de thrombographie en tenant compte des changements à la fois des propriétés pro- et anticoagulantes, ce qui représente une image pertinente de la fonction globale hémostatique.

Par ailleurs, la numération sanguine chez les rats SHR de 12 semaines a montré un nombre de plaquettes et un volume plaquettaire plus élevés. Ceci nous laisse supposer que le plasma du rat SHR serait plus coagulable que le rat Wistar à cet âge. Mais ce résultat n'est pas en accord avec le faible taux de thrombine générée. Ce phénotype d'hypocoagulabilité trouvé dans le plasma des SHR n'est pas influencé par les plaquettes puisque des résultats similaires ont été obtenus dans le PRP et le PDP que ce soit chez les rats de 5 ou de 12 semaines. D'autre part, nos conditions expérimentales de centrifugation, à savoir 13000g à partir de plasma pauvre en plaquettes, a permis l'élimination d'un maximum de cellules circulantes et microparticules dérivées. Ainsi, la faible génération de thrombine dans le plasma du rat SHR est due à des facteurs de coagulation circulant dans le plasma. Les taux plasmatiques en TF, qui se trouve être le déclencheur de la voie extrinsèque de la coagulation, pourraient représenter un mécanisme de la diminution de la génération de thrombine dans le plasma du rat SHR. Par

ailleurs, nos résultats montrent des différences similaires dans les valeurs d'ETP entre le rat SHR et le rat Wistar à des concentrations faibles en TF plus proches de la concentration supposée physiologique. Cependant les très hautes concentrations en TF empêchent, sans doute, un rôle de premier plan du TF dans la faible génération de thrombine dans le plasma des rats SHR.

La prothrombine, l'AT et le TFPI ont été identifiés comme des déterminants majeurs des valeurs de l'ETP (Dielis et al. 2008 ; Nieuwenhuys et al. 2000). Les variations opposées du taux de prothrombine qui est diminué et de la quantité de TFPI libéré dans le plasma et qui se trouve en augmentation significative chez le rat SHR par rapport au rat Wistar a très vraisemblablement contribué à la diminution d'ETP. En effet, l'augmentation significative en ETP induite par addition de prothrombine au plasma du rat SHR appuie le rôle de la concentration de prothrombine en tant que facteur limitant dans la génération de thrombine. De plus, l'addition de TFPI au plasma du rat Wistar induit une réduction significative des ETP qui plaide en faveur d'un rôle du TFPI vasculaire dans la réduction de la génération de thrombine. Il est peu probable que les faibles concentrations plasmatiques en prothrombine ne sont pas dues à un phénomène de consommation lors d'un processus de la coagulation sanguine car les niveaux de TAT ne sont pas élevés. Par contre, l'expression d'ARNm hépatique du gène de la prothrombine était plus faible chez le rat SHR que chez le rat Wistar, ce qui suggère fortement une déficience dans la synthèse de la prothrombine dans le foie. En parallèle, le faible taux d'expression hépatique de l'ARNm du facteur de coagulation FV chez le rat SHR exclut une déficience fonctionnelle en vitamine K, mais suggère plutôt une altération de la fonction hépatique en relation avec une hypertrophie cardiaque.

Si la contribution des composants plasmatiques et des éléments cellulaires circulants du sang est incontestable dans la génération-inhibition de la thrombine en situation physiologiques et pathologiques, la paroi vasculaire est un des principaux facteurs déterminants la réponse thrombotique. De par l'endothélium, la paroi artérielle exerce un rôle anticoagulant en fournissant différents facteurs impliqués dans la régulation de la génération de thrombine.

Nous avons observé des taux plus élevés en TFPI sécrété par des anneaux aortiques du rat SHR par rapport aux anneaux aortiques du rat Wistar. Cela nous amène à considérer que les cellules vasculaires sont peut être impliquées dans l'hyporéactivité *in vivo* du système de coagulation dans le plasma du rat SHR. Les CML et les CE humaines synthétisent d'une manière constitutive des niveaux équivalents en TFPI (Caplice et al. 1998). D'autre part, les CML, qui sont des cellules contenues dans la média, 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'athérothrombose), un phénomène qui se trouve très souvent lié à l'hypertension, puisque celle-ci provoque des lésions au niveau de la couche interne et accroît ainsi le risque d'athérosclérose. 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. Cela suggère que celles-ci pourraient être impliquées dans des mécanismes liés au sang tel que la coagulation.

Pour mieux évaluer cette contribution spécifique de la paroi artérielle dans la génération de thrombine plasmatique, des anneaux artériels du rat SHR ou Wistar ont été ajoutés au même pool de plasma du rat Wistar. Malgré les taux élevés en TFPI sécrété par la paroi aortique du rat SHR en comparaison du rat Wistar, nous avons trouvé que l'addition d'anneaux artériels du rat SHR au même plasma confère un état d'hypercoagulabilité par rapport aux anneaux du rat Wistar et ceci que ce soit des anneaux issus d'aorte thoracique, abdominale ou même de carotide. Dans ces artères, définies comme étant normalement élastiques, la composition est la même et la média présente un nombre de lames élastiques variable en fonction du diamètre de l'artère et un rapport entre élastine et collagène en fonction de la distensibilité de l'artère. Ces résultats suggèrent qu'au-delà de l'effet du TFPI, un autre facteur procoagulant fourni par la surface artérielle jouerait un rôle plus important dans cette hypercoagulabilité des anneaux aortiques. Par ailleurs, nos données démontrent également que les valeurs d'ETP étaient plus élevées à la surface des CML adhérentes issues de rat SHR plutôt que celles issues de rat Wistar. De plus, aucune différence n'est observée pour les CE des deux souches de rat quand ces cellules sont incubées avec le même plasma. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits précédemment par Campbell et al. qui avait comparé la génération de thrombine à la surface de CML aortiques humaines et des HUVEC en présence de PDP de donneurs sains (Campbell et al. 2009). Ceci suggère une contribution majeure des CML dans le phénotype de coagulation de la paroi artérielle.

Le rôle des cellules dans la coagulation est principalement de fournir une surface phospholipidique chargée négativement à l'ensemble de toutes les étapes de la cascade de la coagulation. L'exposition des phosphatidylsérines (Pser) sur le feuillet externe des plaquettes (Monroe et al. 2002) et des cellules vasculaires (Campbell et al. 2009 ; Flynn et al. 1997), qui est régulée par un mécanisme de flip flop, a été soulignée pour évaluer la nature procoagulante des cellules. Nos résultats montrent des quantités accrues en Pser dans les anneaux aortiques et des CML de rats SHR qui pourraient expliquer la génération élevée en

thrombine chez les rats SHR. En comparant les CML aortiques adhérentes et détachées par la trypsine du rat SHR et du rat Wistar, et après les avoir ajustées au même nombre, nous avons montré que la concentration en Pser aux feuillet externes des CML détachées par la trypsine est 50 fois plus élevée que pour les cellules adhérentes. De plus, aucune différence dans les taux de PPA n'est observée pour les CML détachées par la trypsine du rat SHR et le rat Wistar. D'autre part, il a été montré au laboratoire que la génération de thrombine à la surface des CML aortiques de rat Wistar en suspension est significativement plus élevée par rapport aux cellules adhérentes. Ceci peut être expliqué par une activation cellulaire induite par la trypsine, ce qui aboutit à une augmentation de calcium intracellulaire qui à son tour, va induire l'externalisation des phospholipides anioniques du feuillet externe de la membrane plasmatique. (Bever et al. 1998) Les mécanismes de l'augmentation des taux de PPA dans les CML adhérentes des SHR peut être liée à l'hypertension induite par une élévation de calcium intracellulaire (Touyz et al. 1999) le processus de flip flop (Morel et al. 2011) et la réorganisation structurelle des membranes cellulaires chez les SHR.

La génération de thrombine est déclenchée par le TF et la paroi aortique représente une source d'augmentation du TF dans l'hypertension (Corseaux et al. 2002). Comparativement aux rats Wistar, nous avons observé chez les rats SHR, des niveaux plus élevés de TF associé aux CML. Le taux élevé d'activité de TF au niveau des CML adhérentes contraste avec le faible niveau d'activité du TFPI. Il est peu probable que le TFPI joue un rôle majeur dans la régulation négative de la génération de thrombine à la surface des CML des deux souches car le TFPI est connu pour freiner la thrombine en réponse à un faible stimulus procoagulant (Crawley et al. 2008). Cependant, le TF exogène n'augmente la génération de thrombine à la surface des deux souches de rats qu'à partir d'une concentration de plus de 10 pM, c'est-à-dire 20 fois supérieure à la concentration supposée physiologique nécessaire pour déclencher la coagulation. Ce résultat suggère que la génération de thrombine sur les CML des deux souches de rat n'est déclenchée que par le FT exprimé par les cellules elles-mêmes. D'ailleurs, Pathak et al ont montré qu'un anticorps anti- FT diminue la concentration maximale de la thrombine générée à la surface des CML vasculaires humaines adhérentes (Pathak et al. 2006).

Il a été démontré que des protéines spécifiques liées à la membrane régulent la formation des complexes de la coagulation par la localisation et la concentration des facteurs de coagulation à la surface cellulaire (Monroe et al. 2002). Une expression accrue en intégrine  $\alpha_v\beta_3$  dans la paroi des vaisseaux des rats SHR a été rapportée précédemment (Intengan et al. 1999). Ce résultat contraste, cependant, avec nos résultats sur l'expression des ARNm de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$



qui se trouve plus faible dans les CML du rat SHR par rapport au rat Wistar. Ceci est peut être liée à l'état de différenciation des CML en culture primaire de ces rats. En effet, il a été montré que l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est étroitement corrélée avec la différenciation des cellules (Dedhar et al. 1991). Par ailleurs, de nombreuses études ont été réalisées sur les cellules musculaires lisses (CML) issues d'aortes de rats SHR, et ont souvent porté sur l'angiotensine. L'équipe de Fukada et Hu (1999, 2002) ont réalisé un travail original sur le changement phénotypique des CML, ils ont en particulier montré que les rats SHR présentaient une croissance accélérée des CML vasculaires associé à un phénotype sécrétoire. Grâce à des expériences de microarrays, ces chercheurs ont pu étudier la différence d'expression génique et protéique entre les CML des SHR et les CML des WKY. Ils montrent que l'expression de l'alpha-actine, protéine contractile du cytosquelette est diminuée, alors que les facteurs de croissance Transforming Growth Factor-beta 1 ( $TGF\beta-1$ ), platelet-derived growth factor A-chain (PDGF) et basic fibroblast growth factor (bFGF) ont leur niveau d'expression génique augmenté chez les SHR. L'ostéopontine, protéine multifonctionnelle sécrétée, jouant entre autre un rôle dans l'adhésion des CML et marqueur du phénotype sécrétoire a un niveau d'expression plus important chez les SHR par rapport au WKY. Ces résultats suggèrent que les CML lors de l'hypertension présentent un phénotype dédifférencié. Cependant, *in vivo*, les vaisseaux sont en permanence soumis à des contraintes mécaniques associées à la pression artérielle et au flux sanguin, ce qui diffère des conditions de culture *in vitro*. Les forces de cisaillement modulent considérablement la morphologie des cellules vasculaires et leurs fonctions. Les mécanismes par lesquels les cellules vasculaires reçoivent et interprètent les signaux mécaniques extérieurs à l'intérieur des noyaux cellulaires commencent juste à être mis à jour. Actuellement, il est reconnu que les intégrines, les canaux ioniques, PDGF, et les protéines G sont mécano-sensibles, et donc capable de convertir le stimulus mécanique en signaux chimiques. L'activation de voies de signalisations, comme la voie des mitogen-activated protein kinases (MAP-K), des protéines kinase C (PKC), semble augmenter l'activité de facteurs de transcription tel que le SRF. Lorsque ce facteur se lie à l'ADN, de nombreux gènes sont activés, régulant la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la migration et la sécrétion. La compréhension de ces phénomènes ouvrira de nouvelles perspectives dans l'étude des maladies cardiovasculaires et dans leurs traitements.

La rigidification des artères centrales est considérée comme un facteur de risque important de morbidité et de mortalité cardiovasculaire accrue. Les propriétés artérielles mécaniques dépendent de la quantité et de la densité de protéines de la MEC et de l'organisation spatiale

des interactions cellule–matrice (Bezie Y et al. 1998 ; Lacolley et al. 2001 ; Boumaza et al. 2001). Récemment, Qiu et al. ont indiqué que la rigidité aortique accrue dans le vieillissement est non seulement causé par des changements dans la MEC, mais aussi par une augmentation de la rigidité intrinsèque des CML vasculaires (Qiu et al. 2010). Le passage des CML du phénotype contractile au phénotype de synthèse, est contrôlé par de nombreuses voies de régulation de la transcription, notamment par la voie de SRF (Miano et al. 2007). Par interaction avec certains sites, SRF active des gènes spécifiques contractiles dans les CML vasculaires. Le développement de l'hypertension chez le rat SHR est liée à une augmentation de l'affinité de SRF à ces mêmes sites (Han et al.2006). L'inactivation spécifique du gène SRF dans les CML vasculaires fournit l'occasion d'examiner la contribution de la différenciation des CML vasculaires dans la rigidité artérielle *in vivo*. Au niveau de la paroi artérielle, nous avons démontré un défaut de contractilité chez les souris SRF<sup>SMKO</sup>, ce qui peut contribuer à l'augmentation de l'élasticité artérielle. Il a été montré que le NO est impliqué dans la régulation de l'élasticité artérielle (Wilkinson et al. 2002 ; Stewart et al. 2003 ; Bellien et al. 2010). En outre, la dé-endothélialisation a été rapportée comme induisant une augmentation de la compliance artérielle chez le rat (Legrand et al. 1993). En accord avec leur contractilité altérée, les souris SRF<sup>SMKO</sup> présentent une faible réponse au L-NAME par rapport aux souris témoins. Le traitement par L-NAME a nettement augmenté l'élasticité artérielle chez les souris témoins. Cet effet n'a pas été observé dans la carotide des souris SRF<sup>SMKO</sup>. Chez ces dernières, l'altération de la signalisation du NO dans les CML vasculaires ajouté au défaut de tonus vasculaire explique l'absence de réponse au L-NAME. L'augmentation de l'élasticité artérielle chez les souris mutantes SRF<sup>SMKO</sup> est probablement une conséquence de la réduction des protéiques contractiles et des sites d'attachement. La relevance physiopathologique de SRF est établi dans le maintien d'un cytosquelette normal durant le développement. Une analyse par microarrays du profil génique chez ces souris SMKO montre une altération de l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la cascade de coagulation. Des résultats préliminaires au laboratoire ont montré une génération de thrombine augmentée dans le plasma de ces souris par rapport aux contrôles. De plus, les CML invalidées pour le gène SRF en suspension génèrent plus de thrombine que les CML contrôles. Ces résultats suggèrent que l'altération de la différenciation des CML et une diminution du tonus vasomoteur s'accompagnent d'une augmentation de la génération de thrombine dans le plasma et à la surface de ces cellules. Il s'agit maintenant de vérifier les anomalies membranaires responsables de ces phénotypes.

Une élévation de la tension artérielle, comme c'est le cas dans l'hypertension artérielle essentielle, provoque l'expansion de la paroi vasculaire, caractérisée par l'hypertrophie des CML et le maintien du phénotype contractile (Hellstrand et al. 2005). Les CML s'adaptent à un environnement pour une certaine modulation phénotypique correspondant à une fonction précise, y compris la différenciation (Reusch et al. 1996), la prolifération (Wilson et al. 1993), l'apoptose (Wernig et al. 2003) et la migration (von Offenberg Sweeney et al. 2004). Nguyen et al. ont montré que l'expression de PAR-1 est induite par un étirement cyclique (1 Hz, 20%) menant à une augmentation de la prolifération des CML vasculaires en réponse à la thrombine exogène (Nguyen et al. 2001). Les CML vasculaires sont aussi capables de générer leur propre thrombine aux surfaces des cellules grâce à l'exposition des phosphatidylsérine en cas d'apoptose (Flynn et al. 1997), mais aussi dans les CML non-apoptotiques (Pathak et al. 2006). D'autre part, nous venons de montrer que les CML du rat SHR sont plus thrombogènes que les CML du rat Wistar. De plus, des études ont montré la génération de thrombine au sein de la paroi aortique chez un modèle de souris (Pathak et al. 2006). Ceci nous laisse supposer que cette thrombine générée pouvait jouer un rôle autre que la transformation du fibrinogène en fibrine. L'interaction de la thrombine et son récepteur PAR1 dans les CML permet aux cellules de se relaxer et se contracter par la production des différentes molécules. Au niveau pathophysiologique, la thrombine peut agir comme un facteur de croissance participant à la régulation de la prolifération des CML dans le remodelage vasculaire. Ce remodelage intervient dans le processus de l'athérosclérose, de l'hypertension et de la resténose.

Nous avons alors exploré un des effets cellulaires de cette thrombine générée, celui sur la fonction vasculaire de la paroi artérielle d'un animal hypertendu par rapport à un animal normotendu. Les résultats montrent un effet contractile significativement prononcé chez le rat SHR alors que chez le rat Wistar, aucun effet n'est induit par la thrombine. Hormis l'artère pulmonaire (Maki et al. 2010), la thrombine n'induit pas de contraction dans de nombreuses artères normales de la circulation systémique (Hirano, 2007). En revanche, l'expression de PAR1 est régulée positivement et l'effet contractile de la thrombine apparaît dans les lésions vasculaires (Nelken et al, 1992; Ku et Dai 1997; Fukunaga et al. 2006; Kai et al, 2007). La thrombine active, par protéolyse, PAR1 à la surface des CML. Cette activation induit à la fois une élévation de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire et une augmentation de la sensibilité des myofilaments au  $Ca^{2+}$  (Maki et al. 2010). Des études ont montré que l'expression des PARs, en particulier PAR1 et PAR2, est régulée positivement au niveau des CML lors de lésions vasculaires, tandis que leur expression dans les CML des artères normales est limitée (Hirano et al. 2005). Il est ainsi concevable que les PARs jouent un rôle plus important dans le

cadre d'un état pathologique, en particulier dans les lésions vasculaires associées à la formation d'un thrombus. La thrombine n'a montré aucun effet contractile sur l'aorte des modèles de rat normaux, même si elle induit une augmentation des concentrations en  $Ca^{+2}$  cytosolique des CML aortiques de rat (d'après Hirano 2007). Dans les lésions vasculaires plus avancées associées avec un épaississement de la paroi, la réponse vasorelaxante disparaît en faveur d'une réponse contractile plus dominante (Ku et Dai, 1997). Conformément à ces résultats, l'expression de PAR1 est trouvée localisée dans les CE des artères normales, mais aussi dans les CML et les macrophages pariétaux des lésions d'athérosclérose (Nelken et al. 1992). De plus, l'activation de PAR 2 a été montrée comme impliquée dans la réponse vasodilatatrice NO-dépendante associée à des lésions vasculaires dues à l'hypertension (Sobey et al. 1999). PAR1 et PAR2 sont aussi régulée positivement dans les lésions vasculaires chez des modèles expérimentaux et au niveau d'athérosclérose humaine (Wilcox et al. 1994 ; Nelken et al. 1992 ; Damiano et al. 1999). Il en résulte des effets sur les CML tels que la contraction, la migration, la prolifération, l'hypertrophie et la production de la matrice extracellulaire contribuant à une augmentation du tonus vasculaire et le développement des lésions vasculaires.

*Confusion et  
Perspectives*



Alors que la thrombogenèse dans l'hypertension artérielle a été démontré comme dépendante de la dysfonction endothéliale et de l'activation plaquettaire, l'augmentation de la génération de thrombine a également été rapportée comme un mécanisme potentiel.

Nous avons montré un phénotype hypocoagulable dans le plasma du rat SHR qui se traduit par une génération de thrombine beaucoup plus faible dans le plasma du rat SHR par rapport au rat Wistar et ceci peut être expliqué par les taux faibles de prothrombine et élevé en TFPI retrouvé dans le plasma de ces rats.

Contrairement au plasma, nous avons montré un phénotype hypercoagulable de la paroi artérielle du rat SHR et qui se traduit par une génération de thrombine plus élevée à la surface des anneaux aortiques des rats SHR par rapport aux rats Wistar. Ce résultat pourrait être expliqué par l'activité procoagulante de la paroi aortique qui se trouve plus élevée chez le rat SHR par rapport au Wistar.

Nous avons montré que les principales cellules de la paroi vasculaire responsables du phénotype hypercoagulable de la paroi artérielle sont les CML à la surface desquelles la génération de thrombine est plus élevée chez le rat SHR que chez le rat Wistar. Ce résultat semble également être principalement lié à l'augmentation de l'activité procoagulante de la membrane de ces cellules.

Nous avons montré également que la thrombine ainsi générée pouvait avoir des effets cellulaires sur la paroi artérielle et plus spécifiquement sur les CML. L'un de ces effets se trouve être un effet contractile sur la paroi artérielle du rat SHR par rapport au Wistar.

Nous avons également montré que les variations de l'état de différenciation des CML liées à l'inactivation et la surexpression du SRF altèrent à la fois la contraction et la relaxation de la carotide dans le modèle de souris.

En résumé, l'ensemble de nos résultats indique l'implication des CML vasculaires dans le phénotype hypercoagulable de la paroi aortique chez les rats SHR, malgré un phénotype hypocoagulable au niveau du plasma de ces mêmes rats. La génération de thrombine augmentée par les CML peut aussi avoir des effets cellulaires à l'intérieur la paroi vasculaire en particulier les effets mitogènes sur les CML. De plus, l'état de différenciation de ces cellules, joue un rôle dans la distensibilité de l'artère mais probablement aussi dans le phénomène thrombotique.

Pour continuer ce travail, l'avantage potentiel des inhibiteurs directs de la thrombine devrait être étudiée à la fois sur l'équilibre hémostatique et sur la modulation phénotypique cellulaire de l'hypertension et des maladies thrombotiques liés.

Par ailleurs, l'implication des intégrines, en particulier  $\alpha v\beta 3$  (récepteur de la prothrombine), dans la génération de thrombine à la surface des CML devrait être explorée notamment par l'utilisation des siRNA.

L'exploration des effets de la thrombine et d'autres facteurs de coagulation tels que la PCa et les peptides RGD sur la fonction vasculaire de ces modèles expérimentaux avec utilisation des agonistes et antagonistes des récepteurs PARs (PAR1) et des intégrines ( $\alpha v\beta 3$ ) afin de mieux comprendre le mécanisme signalitique à l'origine des effets obtenus.

L'étude de l'impact du degré de différenciation sur le phénotype thrombotique dans un modèle d'hypertension tel que le rat SHR.

Et enfin, comme application médicale, les résultats de ce travail amélioreront notre compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent le phénomène de la rigidité artérielle et l'implication des cellules de la paroi dans l'initiation de la coagulation. La valorisation portera sur l'ingénierie vasculaire. Ces travaux pourront également mener à l'identification de cibles thérapeutiques.



# *Références*



- Abumiya T, Sakata T, Enyoji K, Kato H, Kawai J, Suzuki T, Masuda J, Sasaguri T, Ogata J. (2000) **Does hypertension confer a hypercoagulable state in stroke-prone spontaneously hypertensive rats?** *J Hypertens.* 18:901-909.
- Adams MA, Bobik A, Korner PI. (1989) **Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function.** *Hypertension.* 14(2):191-202.
- Agarwal R, Gomberg-Maitland M. (2011) **Current therapeutics and practical management strategies for pulmonary arterial hypertension.** *Am. Heart J.* 162(2):201-213.
- Albinsson S, Hellstrand P. (2007) **Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle.** *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 293(2):C772-782.
- Andreadis EA, Sfakianakis ME, Tsourous GI, Georgiopoulos DX, Fragouli EG, Katsanou PM, Tavoularis EI, Skarlatou MG, Marakomichelakis GE, Ifanti GK, Diamantopoulos EJ. (2010) **Differential impact of angiotensin receptor blockers and calcium channel blockers on arterial stiffness.** *Int Angiol.* 29(3):266-72
- Arikan E, Sen S. (2005) **Endothelial damage and hemostatic markers in patients with uncomplicated mild-to-moderate hypertension and relationship with risk factors.** *Clin Appl Thromb Hemost.;* 11:147-159.
- Arsenian, S., B. Weinhold, M. Oelgeschlager, U. Ruther, and A. Nordheim. (1998). **Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis.** *EMBO J.* 17:6289-6299.
- Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. (1990) **Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions.** *Hypertension.* 15 (6 Pt 2):699-703
- Barlovatz-Meimon G et Adolphe M, (2003) **Culture de cellules animales--Méthodologies et Applications.** *Inserm.* 916 p
- Battle T, Arnal JF, Challah M, Michel JB. (1994) **Selective isolation of rat aortic wall layers and their cell types in culture--application to converting enzyme activity measurement.** *Tissue Cell.* 26(6):943-55.
- Bauersachs J, Bouloumié A, Mülsch A, Wiemer G, Fleming I, Busse R (1998) **Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production.** *Cardiovasc Res.* 37(3):772-9.

- Baugh RJ, Broze GJ Jr, Krishnaswamy S. (1998) **Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor.** *J Biol Chem.* 273(8):4378-86.
- Bellien J, Favre J, Iacob M, Gao J, Thuillez C, Richard V, Joannidès R. (2010) **Arterial stiffness is regulated by nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor during changes in blood flow in humans.** *Hypertension.* 55(3):674-80. Epub 2010 Jan 18.
- Benetos, A., C. Adamopoulos, J. M. Bureau, M. Temmar, C. Labat, K. Bean, F. Thomas, B. Pannier, R. Asmar, M. Zureik, M. Safar and L. Guize. (2002) **Determinants of accelerated progression of arterial stiffness in normotensive subjects and in treated hypertensive subjects over a 6-year period.** *Circulation.* 105(10): 1202-7.
- Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Harmsma M, Zwaal RF. (1998) **Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling.** *Lupus.* 7 Suppl 2:S126-31.
- Bezie, Y., P. Lacolley, S. Laurent and G. Gabella (1998a). **Connection of smooth muscle cells to elastic lamellae in aorta of spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 32(1): 166-9.
- Bezie, Y., J. M. Lamaziere, S. Laurent, P. Challande, R. S. Cunha, J. Bonnet and P. Lacolley (1998b). **Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(7): 1027-34.
- Birks EJ, Yacoub MH. (1997). **The role of nitric oxide and cytokines in heart failure.** *Coron Artery Dis.* 8(6):389-402
- Blann AD, Naqvi T, Waite M, McCollum CN (1993). **von Willebrand factor and endothelial damage in essential hypertension.** *J Hum Hypertens;* 7:107±111.
- Boneu B, Cazenave JP. (1997) **Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose.**; 2ed. Reims: Boehringer Ingelheim France.
- Borissoff, J. I., H. M. Spronk, S. Heeneman and H. ten Cate (2009). **Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze?** *Cardiovasc Res* 82(3): 392-403.
- Bouloumié A, Bauersachs J, Linz W, Schölkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R. (1997). **Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production.** *Hypertension.* 30(4):934-41.
- Boumaza S, Arribas SM, Osborne-Pellegrin M, McGrath JC, Laurent S, Lacolley P, Challande P. (2001). **Fenestrations of the carotid internal elastic lamina and**

- structural adaptation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension*. 37(4):1101-7.
- Bretschneider E, Uzonyi B, Weber A, Fischer JW, Pape R, Lötzer K, et al. (2007). **Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor.** *Circ. Res.* 100(2):255-262.
  - Broze GJ Jr, Girard TJ, Novotny WF. (1990). **Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor.** *Biochemistry*. 29(33):7539-46.
  - Burton, A. C. (1954). **Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels.** *Physiol Rev* 34(4): 619-42.
  - Butenas S, Mann KG. (2002) **Blood coagulation.** *Biochemistry Mosc.* 67 (1):3-12.
  - Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. (2005) **Tissue factor activity in whole blood.** *Blood*. 105, 2764-70.
  - Cai H, Harrison DG. (2000). **Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.** *Circ Res.* 87 (10):840-4.
  - Campbell,D.M., Hall,M.H., Barker,D.J., Cross,J., Shiell,A.W. and Godfrey,K.M. (1996) **Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later.** *Br.J Obstet Gynaecol.* **103**, 273-280.
  - Campbell, R. A., K. A. Overmyer, C. H. Selzman, B. C. Sheridan and A. S. Wolberg (2009). **Contributions of extravascular and intravascular cells to fibrin network formation, structure, and stability.** *Blood* **114**(23): 4886-96.
  - Campese VM (1994) **Salt sensitivity in hypertension: renal and cardiovascular implications.** *Hypertension* 23 531–550
  - Cantini, C., P. Kieffer, B. Corman, P. Liminana, J. Atkinson and I. Lartaud-Idjouadiene (2001). **Aminoguanidine and aortic wall mechanics, structure, and composition in aged rats.** *Hypertension* 38(4): 943-8.
  - Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, Peterson TE, Broze GJ Jr, Simari RD. (1998) **Expression of tissue factor pathway inhibitor in vascular smooth muscle cells and its regulation by growth factors.** *Circ Res.*;83(12):1264-70.
  - Chamiot-Clerc P, Renaud JF, Safar ME. (2001) **Pulse pressure, aortic reactivity, and endothelium dysfunction in old hypertensive rats.** *Hypertension*. 37(2):313-21
  - Chang JY, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. (1999). **TFPIbeta, a second product from the mouse tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene.** *Thromb Haemost* 81: 45–9.

- Chang J, Wei L, Otani T, Youker KA, Entman ML, Schwartz RJ. **Inhibitory cardiac transcription factor, srf-n, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading.** *Circulation*. 2003;108:407-413.
- Chapman GB, Durante W, Hellums JD, Schafer AI. (2000) **Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells.** *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278(3):H748-754.
- Charvet, C et al. (2006) **New Role for Serum Response Factor in Postnatal Skeletal Muscle Growth and Regeneration via the Interleukin 4 and Insulin-Like Growth Factor 1 Pathways.** *Mol Cell Biol.* 26 (17):6664-74.
- Cheng J, Zhang J, Merched A, Zhang L, Zhang P, Truong L, et al. (2007) **Mechanical stretch inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells by up-regulating integrin alphavbeta3 and stablization of PINCH-1.** *J. Biol. Chem.* 282(47):34268-34275.
- Chow N, Bell RD, Deane R, Streb JW, Chen J, Brooks A, Van Nostrand W, Miano JM, Zlokovic BV. **Serum response factor and myocardin mediate arterial hypercontractility and cerebral blood flow dysregulation in alzheimer's phenotype.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:823-828.
- Clark, J. M. and S. Glagov (1985). **Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited.** *Arteriosclerosis* 5(1): 19-34.
- Collen D, Lijnen HR. (2009). **The tissue-type plasminogen activator story.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29(8):1151-1155.
- Corman, B., M. Duriez, P. Poitevin, D. Heudes, P. Bruneval, A. Tedgui and B. I. Levy (1998). **Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3): 1301-6.
- Corseaux D, Ollivier V, Fontaine V, Huisse MG, Philippe M, Louedec L, Vranckx R, Ravanat C, Lanza F, Angles-Cano E, Guillin MC, Michel JB. (2002). **Hemostasis imbalance in experimental hypertension.** *Mol Med.* 8:169-178.
- Crawley JT, Lane DA. (2008). **The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(2):233-42.
- Cromer WE, Mathis JM, Granger DN, Chaitanya GV, Alexander JS. (2011). **Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases.** *World J. Gastroenterol.* 17(5):578-593.
- Cushman M, Yanez D, Psaty BM, Fried LP, Heiss G, Lee M, et al. (1996). **Association of Fibrinogen and coagulation factors VII and VIII with cardiovascular risk**

- factors in the elderly: the Cardiovascular Health Study.** *Am J Epidemiol*; 143:665-676.
- Dahl LK, Heine M and Tassinari L (1962) **Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion.** *Nature (London)* 194 480–482
  - Dahlback B, Villoutreix BO. (2005). **The anticoagulant protein C pathway.** *FEBS Lett*, 579, 3310-6.
  - Dahlbäck B (2007). **The tale of protein S and C4b-binding protein, a story of affection.** *Thromb Haemost.* 98(1):90-6.
  - Damiano BP, D'Andrea MR, de Garavilla L, Cheung WM, Andrade- Gordon P. (1999). **Increased expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in balloon-injured rat carotid artery.** *Thromb Haemost.*; 81:808–814.
  - Dedhar S, Robertson K, Gray V. (1991). **Induction of expression of the alpha v beta 1 and alpha v beta 3 integrin heterodimers during retinoic acid-induced neuronal differentiation of murine embryonal carcinoma cells.** *J Biol Chem.* Nov 15;266(32):21846-52.
  - Delpy E, Coste H, Gouville AC. (1996). **Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3.** *Br J Pharmacol.* 119(3):471-8
  - Derian CK, Santulli RJ, Tomko KA, Haertlein BJ, Andrade-Gordon P. (1995). **Species differences in platelet responses to thrombin and SFLLRN receptor-mediated calcium mobilization and aggregation, and regulation by protein kinases.** *Thromb Res.* 78(6):505-19.
  - Dielis AW, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Hamulyák K, Ten Cate H, Rosing J. (2008). **Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population.** *J Thromb Haemost.* 6(1):125-31.
  - Diguët N, Mallat Y, Ladouce R, Clodic G, Prola A, Tritsch E, Blanc J, Larcher JC, Delcayre C, Samuel JL, Friguet B, Bolbach G, Li Z, Mericskay M. **Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy.** *J Biol Chem.* 2011;286:35007-35019.
  - Emeis JJ, Jirouskova M, Muchitsch EM, Shet AS, Smyth SS, Johnson GJ. (2007). **A guide to murine coagulation factor structure, function, assays, and genetic alterations.** *J Thromb Haemost.* 5(4):670-9

- Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. (1982). **Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation.** *J Biol Chem.* 257, 7944-7.
- Esmon NL, Carroll RC, Esmon CT. (1983). **Thrombomodulin blocks the ability of thrombin to activate platelets.** *J Biol Chem.* 258, 12238-42.
- Esmon CT. (1989). **The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation.** *J Biol Chem.* 264, 4743-6.
- Esmon CT, Gu JM, Xu J, Qu D, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. (1999). **Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway.** *Haematologica.* 84, 363-8.
- Esmon CT. (2003). **The protein C pathway.** *Chest.* 124, 26S-32S.
- Flick MJ, Du X, Witte DP, Jirouskova M, Soloviev DA, Busuttill SJ, Plow EF, Degen JL. (2004). **Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor alphaMbeta2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo.** *J Clin Invest* 113: 1596–606.
- Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR. (1997). **Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells.** *Blood.* 89(12):4378-4384.
- Folkow B. (1993). **Early structural changes in hypertension: pathophysiology and clinical consequences.** *J Cardiovasc Pharmacol* 22 (Suppl 1):S1–S6.
- Forstermann U., Closs E.I., Pollock J.S. et al. (1994) **Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.** *Hypertension* 23, 1121-1131.
- Freedman JE. (2008). **Oxidative stress and platelets.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28(3):s11-16.
- Fuchs LC, Hoque AM and Clarke NL (1998). **Vascular and hemodynamic effects of behavioral stress in borderline hypertensive and Wistar-Kyoto rats.** *Am. J. Physiol.-Reg. I.* 274 R375–R382
- Fukunaga R, Hirano K, Hirano M, Niuro N, Nishimura J, Maehara Y et al. (2006). **Upregulation of proteinase-activated receptors and hypercontractile responses precede development of arterial lesions after balloon injury.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2388– H2395.
- Gabella, G. (1984). **Structural apparatus for force transmission in smooth muscles.** *Physiol Rev* 64(2): 455-77.



- Galis, Z. S., R. Kranzhofer, J. W. Fenton, 2nd and P. Libby (1997). **Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(3): 483-9.
- Gary-Bobo G, Parlakian A, Escoubet B, Franco CA, Clement S, Bruneval P, Tuil D, Daegelen D, Paulin D, Li Z, Mericskay M.( 2008) **Mosaic inactivation of the serum response factor gene in the myocardium induces focal lesions and heart failure.** *Eur J Heart Fail.* 10:635-645.
- Gentry PA. (2003). **Comparative aspects of blood coagulation.** *The veterinary journal.* 168 ;238-251
- Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. (1999). **Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2311-5.
- Giummelly, P., I. Lartaud-Idjouadiene, V. Marque, N. Niederhoffer, J. M. Chillon, C. Capdeville-Atkinson and J. Atkinson (1999). **Effects of aging and antihypertensive treatment on aortic internal diameter in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 34(2): 207-11.
- Gomibuchi H, Okazaki M, Iwai S, Kumai T, Kobayashi S, Oguchi K. (2007). **Development of hyperfibrinogenemia in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats: a potentially useful animal model as a complication of hypertension and hyperlipidemia.** *Exp Anim.* 56 :1-10.
- Haga JH, Li YJ, Chien S. (2007). **Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells.** *J Biomech.* 40(5):947-960.
- Halka, A. T., N. J. Turner, A. Carter, J. Ghosh, M. O. Murphy, J. P. Kirton, C. M. Kielty and M. G. Walker (2008). **The effects of stretch on vascular smooth muscle cell phenotype in vitro.** *Cardiovasc Pathol* **17**(2): 98-102.
- Han YJ, Hu WY, Chernaya O, Antic N, Gu L, Gupta M, Piano M, de Lanerolle P. (2006). **Increased myosin light chain kinase expression in hypertension: Regulation by serum response factor via an insertion mutation in the promoter.** *Mol Biol Cell.* 17:4039-4050
- Hara T, Yokoyama A, Morishima Y, Kunitada S. (1995). **Species differences in anticoagulant and anti-Xa activity of DX-9065a, a highly selective factor Xa inhibitor.** *Thromb Res.* 80(1):99-104.

- Hellstrand, P. and S. Albinsson (2005). **Stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle: role of the actin cytoskeleton.** *Can J Physiol Pharmacol* **83**(10): 869-75.
- Henning EC, Warach S and Spatz M (2010). **Hypertension-induced vascular remodeling contributes to reduced cerebral perfusion and the development of spontaneous stroke in aged SHRSP rats.** *J. Cerebr. Blood F. Met.* **30** 827–836.
- Hirano, K. and H. Kanaide (2003). **Role of protease-activated receptors in the vascular system.** *J Atheroscler Thromb* **10**(4): 211-25.
- Hirano K. (2006). **Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca<sup>2+</sup> sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle.** *J Pharmacol Sci.* **104**(2):109-15.
- Hirano K. (2007). **The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **27**(1):27-36 Epub 2006 Nov 9
- Iams SG, Wexler BC. (1979). **Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol.** *J Lab Clin Med.* **94**(4):608-16.
- Ignarro,L.J., Cirino,G., Casini,A. and Napoli,C. (1999). **Nitric oxide as a signalling molecule in the vascular system: an overview.** *J Cardiovasc Pharmacol.* **34**, 879-886.
- Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL. (1999). **Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition.** *Circulation.* **100**(22):2267-75.
- Ishikawa S, Kario K, Nago N, Kayaba K, Hiraoka J, Matsuo H, et al. (1997). **Factor VII and Fibrinogen levels examined by age, sex, and other atherosclerotic risk factors in a Japanese population. The Jichi Medical School Cohort Study.** *Thromb Haemost;* **77**:890±893.
- Ishimitsu T, Numabe A, Masuda T, Akabane T, Okamura A, Minami J, Matsuoka H. (2009). **Angiotensin-II receptor antagonist combined with calcium channel blocker or diuretic for essential hypertension.** *Hypertens Res.* **32**(11):962-8.
- Jin RC, Voetsch B, Loscalzo J. (2005). **Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function.** *Microcirculation.* **12**(3):247-258.

- Jirousková M, Smyth SS, Kudryk B, Coller BS. (2001). **A hamster antibody to the mouse fibrinogen gamma chain inhibits platelet-fibrinogen interactions and FXIIIa-mediated fibrin cross-linking, and facilitates thrombolysis.** *Thromb Haemost.* 86(4):1047-56.
- John S, Schmieder RE. (2003). **Potential mechanisms of impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia.** *Curr Hypertens Rep.* 5(3):199-207.
- Junker R, Heinrich J, Schulte H, Erren M, Assmann G. (1998). **Hemostasis in normotensive and hypertensive men: results of the PROCAM study.** *J Hypertens;* 16:917±923.
- Kai Y, Hirano K, Maeda Y, Nishimura J, Sasaki T, Kanaide H (2007). **Prevention of the hypercontractile response to thrombin by proteinase-activated receptor-1 antagonist in subarachnoid hemorrhage.** *Stroke* 38: 3259–3265.
- Kakar P, Lip GY. (2007). **Hypertension: endothelial dysfunction, the prothrombotic state and antithrombotic therapy.** *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 5(3):441-50
- Kanda Y.K. Mizuno Y. Kuroki and Y. Watanabe (2001). **Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway.** *Br J Pharmacol* 132(8): 1657-64.
- Kass DA. **Ventricular arterial stiffening: integrating the pathophysiology.** *Hypertension.* (2005) 46:185-193.
- Katsuya Hirano. **The Roles of Proteinase-Activated Receptors in the Vascular Physiology and Pathophysiology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2007) 27;27-36;
- Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. **Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives.** *Circ. J.* (2010) 74(5):836-843.
- Klöb, S., Bouloumié, A. & Mülsch, A. (2000). **Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase.** *Hypertension* , 35, 43-47.
- Komiyama Y, Pedersen AH, Kiesel W. **Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor.** *Biochemistry*, (1990) 29, 9418-25.
- Ku DD, Dai J (1997). **Expression of thrombin receptors in human atherosclerotic coronary arteries leads to an exaggerated vasoconstrictory response in vitro.** *J Cardiovasc Pharmacol* 30: 649–657

- Kuhbandner S, Brummer S, Metzger D, Chambon P, Hofmann F, Feil R. (2000). **Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle.** *Genesis*. 28:15-22
- Kurtz TW, Morris RC. (1987). **Biological variation in WKY rats: implications for research with the spontaneously hypertensive rat.** *Hypertension* 10:127–131.
- Lacolley P, Challande P, Boumaza S, Cohuet G, Laurent S, Boutouyrie P, Grimaud JA, Paulin D, Lamazière JM, Li Z. (2001). **Mechanical properties and structure of carotid arteries in mice lacking desmin.** *Cardiovasc Res*. 51(1):178-87.
- Lacolley P., C. Labat, A. Pujol, C. Delcayre, A. Benetos and M. Safar (2002). **Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone.** *Circulation* 106(22): 2848-53.
- Lacolley, P. (2007). **Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux**, John Libbey Eurotext.
- Lacolley P, Challande P, Osborne-Pellegrin M, Regnault V. (2009). **Genetics and pathophysiology of arterial stiffness.** *Cardiovasc Res*. 81:637-648
- Landerholm TE, Dong XR, Lu J, Belaguli NS, Schwartz RJ, Majesky MW. (1999). **A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells.** *Development*. 126(10):2053-62.
- Landin K, Tengborn L, Smith U. (1990). **Elevated Fibrinogen and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in hypertension are related to metabolic risk factors for cardiovascular disease.** *J Intern Med*; 227:273±278.
- Laurent, S., P. Boutouyrie, R. Asmar, I. Gautier, B. Laloux, L. Guize, P. Ducimetier and A. Benetos (2001). **Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients.** *Hypertension* 37(5): 1236-41.
- Lawson JH, Mann KG. (1991). **Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation.** *J Biol Chem*, 266, 11317-27.
- Lee AJ, Fowkes GR, Lowe GD, Rumley A. (1995). **Determinants of Fibrin D-dimer in the Edinburgh Artery Study.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 15:1094±1097.
- Legrand MC, Benessiano J, Levy BI. (1993). **Endothelium, mechanical compliance, and cGMP content in the carotid artery from spontaneously hypertensive rats.** *J Cardiovasc Pharmacol*. 21:S26-30
- Lehoux S, Tedgui A. (2003). **Cellular mechanics and gene expression in blood vessels.** *J Biomech*. 36 (5):631-43.

- Lemne C, De Faire U. (1996). **Elevation of plasminogen activator inhibitor 1 in borderline hypertension is linked to concomitant metabolic disturbances.** *Eur J Clin Invest*; 26:692±697.
- Levesque MJ, Nerem RM. (1985). **The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress.** *J Biomech Eng.* 107(4):341-7.
- L'Heureux N, Pâquet S, Labbé R, Germain L, Auger FA. (1998). **A completely biological tissue-engineered human blood vessel.** *FASEB J.* 12(1):47-56
- Lijnen HR, van Hoef B, Beelen V, Collen D. (1994). **Characterization of the murine plasma fibrinolytic system.** *Eur J Biochem.* 224(3):863-71.
- Lindpaintner K, Kreutz R, Ganten D. (1992). **Genetic variation in hypertensive and 'control' strains. What are we controlling for anyway?** *Hypertension.* 19(5):428-30.
- Lip GY, Li-Saw-Hee FL. (1998). **Does hypertension confer a hypercoagulable state?** *J Hypertens.* 16:913-916.
- Louis H, Kakou A, Regnault V, Labat C, Bressenot A, Gao-Li J, Gardner H, Thornton SN, Challande P, Li Z, Lacolley P. (2007). **Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H2597-2604
- Lüscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM. (1990). **Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat.** *Am J Hypertens.* 3(1):55-8.
- Lüscher TF, Oemar BS, Yang Z, Noll G. (1996). **Molecular and cellular mechanisms of arteriosclerosis and restenosis: possibilities of gene therapy.** *Z Kardiol.* 85(7):495-508.
- Lwaleed BA, Bass PS. (2006). **Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease.** *J Pathol.* 208(3):327-39
- Mahmud A, Feely J. (2002). **Reduction in arterial stiffness with angiotensin II antagonist is comparable with and additive to ACE inhibition.** *Am J Hypertens.* 15(4 Pt 1):321-5.
- Maki J, Hirano M, Hoka S, Kanaide H, Hirano K. (2010). **Thrombin activation of proteinase-activated receptor 1 potentiates the myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and induces vasoconstriction in porcine pulmonary arteries.** *Br J Pharmacol.* 159(4):919-27.
- Maroney SA, Mast AE. (2008). **Expression of tissue factor pathway inhibitor by endothelial cells and platelets.** *Transfus. Apher. Sci.* 38(1):9-14.

- Marque, V., P. Kieffer, J. Atkinson and I. Lartaud-Idjouadiene (1999). **Elastic properties and composition of the aortic wall in old spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 34(3): 415-22.
- Martin, K., S. Weiss, P. Metharom, J. Schmeckpeper, B. Hynes, J. O'Sullivan and N. Caplice (2009). **Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin.** *Circ Res* 105(3): 214-8.
- Mather KJ, Mirzamohammadi B, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. (2002). **Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes.** *Diabetes*. 51(12):3517-23.
- McBane RD 2nd, Miller RS, Hassinger NL, Chesebro JH, Nemerson Y, Owen WG. (1997). **Tissue prothrombin. Universal distribution in smooth muscle.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17(11):2430-6
- McDonald OG, Owens GK. (2007). **Programming smooth muscle plasticity with chromatin dynamics.** *Circ Res*. 100(10):1428-41
- McGrath, J. C., S. M. Arribas, C. J. Daly and J. F. Gordon (1995). **Confocal microscopy for structure and real-time pharmacology in blood vessels.** *J Hum Hypertens* 9(8): 645-7.
- McGuire PG, Tweitmeyer TA. (1985). **Aortic endothelial functions in developing hypertension.** *Hypertension* 7:483-490.
- McNamara, C. A., I. J. Sarembock, L. W. Gimple, J. W. Fenton, 2nd, S. R. Coughlin and G. K. Owens (1993). **Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor.** *J Clin Invest* 91(1): 94-8.
- Mericskay M, Blanc J, Tritsch E, Moriez R, Aubert P, Neunlist M, Feil R, Li Z. ( 2007) **Inducible mouse model of chronic intestinal pseudo-obstruction by smooth muscle-specific inactivation of the srf gene.** *Gastroenterology*. 133:1960-1970.
- Miano JM, Ramanan N, Georger MA, de Mesy Bentley KL, Emerson RL, Balza RO Jr, Xiao Q, Weiler H, Ginty DD, Misra RP. (2004) **Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:17132-17137.
- Miano JM, Long X, Fujiwara K. (2007). **Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus.** *Am J Physiol Cell Physiol*. 292:C70-81

- Michiels C. (2003). **Endothelial cell functions.** *J. Cell. Physiol.* 196(3):430-443.
- Miletich JP, Jackson CM, Majerus PW. (1978). **Properties of the factor Xa binding site on human platelets.** *J Biol Chem.* 253(19):6908-16.
- Milstien S, Katusic Z. (1999). **Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function.** *Biochem Biophys Res Commun.* 263(3):681-4.
- Miura H, Gutterman DD. (1998). **Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 monooxygenase and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels.** *Circ Res.* 83(5):501-7.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991). **Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.** *Pharmacol Rev.* 43(2):109-42.
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. (2002). **Platelets and thrombin generation.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22(9):1381-1389.
- Morel O et al. 2011 Morel O, Jesel L, Freyssinet J, Toti F. (2011). **Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31(1):15-26.
- Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. (1993) **Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation.** *Blood*, 81, 734-44.
- Mullins JJ, Peters J and Ganten D (1990) **Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene.** *Nature (London)* 344 541–544
- Nagao T, Vanhoutte PM. (1992). **Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery.** *J Physiol.* Jan;445:355-67.
- Nagase M, Shibata S, Yoshida S, Nagase T, Gotoda T and Fujita T (2006). **Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker.** *Hypertension* 47 1084–1093
- Nakagaki T, Foster DC, Berkner KL, Kiesel W. (1991). **Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII.** *Biochemistry* 30, 10819-24.
- Nelken NA, Soifer SJ, O'Keefe J, Vu TK, Charo IF, Coughlin SR. (1992). **Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries.** *J Clin Invest.* 90(4):1614-21.

- Neuman, R. E. and M. A. Logan (1950). **The determination of hydroxyproline.** *J Biol Chem* 184(1): 299-306.
- Nguyen, K. T., S. R. Frye, S. G. Eskin, C. Patterson, M. S. Runge and L. V. McIntire (2001). **Cyclic strain increases protease-activated receptor-1 expression in vascular smooth muscle cells.** *Hypertension* 38(5): 1038-43.
- Nichols, W. W. and M. O'Rourke (1998). **McDonald's blood flow in arteries. Theoretical, experimental and clinical principles.** London, Sydney, Auckland, Arnold E.
- Nieuwenhuys CM, Feijge MA, Béguin S, Heemskerk JW. (2000). **Monitoring hypocoagulant conditions in rat plasma: factors determining the endogenous thrombin potential of tissue factor-activated plasma.** *Thromb Haemost.* 84(6):1045-51.
- Niitsu Y, Jakubowski JA, Sugidachi A, Asai F. (2005). **Pharmacology of CS-747 (prasugrel, LY640315), a novel, potent antiplatelet agent with in vivo P2Y12 receptor antagonist activity.** *Semin Thromb Hemost.* 31(2):184-94
- Novotny WF, Brown SG, Miletich JP, Rader DJ, Broze GJ Jr. (1991). **Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples.** *Blood.*;78(2):387-93.
- Okamoto K and Aoki K (1963) **Development of a strain of spontaneously hypertensive rats.** *Jpn. Circulation J.* 27 282–293
- Okamoto K, Yamori Y and Nagaoka A (1974) **Establishment of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR).** *Circ. Res.* 34/35 143–153
- Olson EN, Nordheim A. (2010). **Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(5):353-65.
- Osterud B. (2001). **The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor.** *Semin Hematol.* 38, 2-5.
- Owens, G. K. (1995). **Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells.** *Physiol Rev* 75(3): 487-517.
- Owens, G. K. (1996). **Role of mechanical strain in regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells.** *Circ Res* 79(5): 1054-5.
- Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. (1988). **L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation.** *Biochem Biophys Res Commun.* 153(3):1251-6.



- Papapetropoulos A, Marczin N, Snead MD, Cheng C, Milici A, Catravas JD. (1994). **Smooth muscle cell responsiveness to nitrovasodilators in hypertensive and normotensive rats.** *Hypertension*. 23(4):476-84.
- Parlakian A, Tuil D, Hamard G, Tavernier G, Hentzen D, Concordet JP, Paulin D, Li Z, Daegelen D. (2004). **Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality.** *Mol Cell Biol*. 24:5281-5289
- Parlakian A, Charvet C, Escoubet B, Mericskay M, Molkentin JD, Gary-Bobo G, De Windt LJ, Ludosky MA, Paulin D, Daegelen D, Tuil D, Li Z. (2005) **Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the srf gene in adult heart.** *Circulation*.112:2930- 2939.
- Pathak, A., R. Zhao, D. M. Monroe, H. R. Roberts, B. C. Sheridan, C. H. Selzman and Stouffer G. A. (2006). **Thrombin generation in vascular tissue.** *J Thromb Haemost* 4(1): 60-7.
- Patterson, C., G. A. Stouffer, N. Madamanchi and M. S. Runge (2001). **New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology.** *Circ Res* 88(10): 987-97.
- Pedersen B, Holscher T, Sato Y, Pawlinski R, Mackman N. (2005). **A balance between tissue factor and tissue factor pathway inhibitor is required for embryonic development and hemostasis in adult mice.** *Blood*. 105(7):2777-82.
- Perera L, Foley C, Darden TA, Stafford D, Mather T, Esmon CT, Pedersen LG. (2000). **Modeling zymogen protein C.** *Biophys J*. 79, 2925-43.
- Phillips GB, Jing TY, Resnick LM, Barbagallo M, Laragh JH, Sealey JE. (1993). **Sex hormones and hemostatic risk factors for coronary heart disease in men with hypertension.** *J Hypertens*; 11:699±702.
- Qiu, H.Y., Henrion, D. Benessiano, J. Heymes, C., Tournier, B., Levy, B.I. (1998). **Decreased flow-induced dilation and increased production of cGMP in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension*. 32:1098-1103.
- Qiu, H., Y. Zhu, Z. Sun, J. P. Trzeciakowski, M. Gansner, C. Depre, R. R. Resuello, F. F. Natividad, W. C. Hunter, G. M. Genin, E. L. Elson, D. E. Vatner, G. A. Meininger and S. F. Vatner (2010). **Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging.** *Circ Res* 107(5): 615-9.

- Qu M, Liu B, Wang H, Yan Z, Shen B, Jiang Z. (2007). **Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain.** *J. Vasc. Res.* 44(5):345-353.
- Rao, G. N., P. Delafontaine and M. S. Runge (1995). **Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells.** *J Biol Chem* 270(46): 27871-5.
- Rao, G. N. and M. S. Runge (1996). **Cyclic AMP inhibition of thrombin-induced growth in vascular smooth muscle cells correlates with decreased JNK1 activity and c-Jun expression.** *J Biol Chem* 271(34): 20805-10.
- Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. (2007). **Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis.** *J. Thromb. Haemost.* 5 Suppl 1:102-115.
- Regan, C. P., P. J. Adam, C. S. Madsen and G. K. Owens (2000). **Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury.** *J Clin Invest* 106(9): 1139-47.
- Regnault V, Perret-Guillaume C, Kearney-Schwartz A, Max J, Labat C, Louis H, et al. (2011). **Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31(5):1226-1232.
- Reusch P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE. (1996). **Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells.** *Circ Res.* 79(5):1046-53.
- Robert L, B. P. (1987). **La matrice extra-cellulaire de la paroi artérielle. Les maladies de la paroi artérielle.** F. Médecine-sciences, Camillieri JP, Berry CL, Fiessinger JN, et al. 23: 31-43.
- Rodgers GM. (1988). **Vascular smooth muscle cells synthesize, secrete and express coagulation factor V.** *Biochim. Biophys. Acta.* 968(1):17-23.
- Roveri, N., A. Ripamonti, S. Garbisa and D. Volpin (1978). **Structural organization of collagen fibrils in media aortic wall.** *Connect Tissue Res* 5(4): 249-53.
- Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HH. (1999). **Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats.** *Circ Res.* 85(6):534-41.

- Safar, M., Chamiot-Clerc, P., Dagher, G., Renaud, J.F. (2001). **Pulse pressure, endothelium function, and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 38:1416-1421.
- Safar, M. E. and A. Benetos (2003). **Factors influencing arterial stiffness in systolic hypertension in the elderly: role of sodium and the renin-angiotensin system.** *Am J Hypertens* 16(3): 249-58.
- Safar, M. E., B. I. Levy and H. Struijker-Boudier (2003). **Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases.** *Circulation* 107(22): 2864-9.
- Sanders BJ and Lawler JE (1992). **The borderline hypertensive rat (BHR) as a model for environmentally-induced hypertension: a review and update.** *Neurosci. Biobehav. R.* 16 207 217
- Sawada K, Naiki M, Yago H, Matsushita K, Ohtsuki T, Kitagawa K, Matsumoto M, Hori M. (2003). **Hypertension associated with reduced plasma thrombomodulin levels and a hypercoagulable state in rats.** *Clin Exp Hypertens.* 25:73-84.
- Shaw, A. and Q. Xu (2003). **Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update.** *Curr Vasc Pharmacol* 1(1): 41-58.
- Shimizu S, Ishii M, Yamamoto T, Kawanishi T, Momose K, Kuroiwa Y. (1994). **Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cell.** *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 84:301-314
- Shimokawa H, Nakaike R, Takeshita A. (1995). **Significance of defective endothelial signal transduction in impaired endothelium-dependent relaxation in atherosclerosis.** *Gerontology.* 41 Suppl 1:28-33.
- Sidhu P, Sutherland SB, Ganguly P. (1979). **Interaction of thrombin with mammalian platelets.** *Am J Physiol.* 237(3):H353-8.
- Smith TL, Hutchins PM. (1979). **Central hemodynamics in the developmental stages of spontaneous hypertension in the anaesthetized rat.** *Hypertension* 1:508–517.
- Sobey CG, Moffatt JD, Cocks TM. (1999). **Evidence for selective effects of chronic hypertension on cerebral artery vasodilatation to protease-activated receptor-2 activation.** *Stroke.* 30(9):1933-40; discussion 1941.
- Soff GA, Jackman RW, Rosenberg RD. (1991). **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.* 77(3):515-8.
- Steinberg, H. O., H. Chaker, R. Leaming, A. Johnson, G. Brechtel and A. D. Baron (1996). **Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance.** *J Clin Invest* 97(11): 2601-10.
  - Stewart AD, Millasseau SC, Kearney MT, Ritter JM, Chowienczyk PJ. (2003). **Effects of inhibition of basal nitric oxide synthesis on carotid-femoral pulse wave velocity and augmentation index in humans.** *Hypertension.* 42:915-918
  - Stouffer, G. A. and S. S. Smyth (2003). **Effects of thrombin on interactions between beta3-integrins and extracellular matrix in platelets and vascular cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(11): 1971-8.
  - Su, B. Y., K. M. Shontz, N. A. Flavahan and P. T. Nowicki (2006). **The effect of phenotype on mechanical stretch-induced vascular smooth muscle cell apoptosis.** *J Vasc Res* 43(3): 229-37.
  - Taubman MB, Marmur JD, Rosenfield CL, Guha A, Nichtberger S, Nemerson Y. (1993). **Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca<sup>2+</sup> mobilization and protein kinase C activation.** *J. Clin. Invest.* 91(2):547-552.
  - Taylor KR, Gallo RL. (2006). **Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation.** *FASEB J.* 20(1):9-22.
  - Tedgui A, Levy B. (1994). **Biologie de la paroi artérielle - aspects normaux et pathologiques.** Paris : Masson 87 p.
  - Tesfamariam B, Weisbrod RM, Cohen RA. (1989). **The endothelium inhibits activation by calcium of vascular neurotransmission.** *Am J Physiol.* 257(6 Pt 2):H1871-7
  - Thorin E, Shatos MA, Shreeve SM, Walters CL, Bevan JA. (1997). **Human vascular endothelium heterogeneity. A comparative study of cerebral and peripheral cultured vascular endothelial cells.** *Stroke.* 28(2):375-81.
  - Tokunou, T., T. Ichiki, K. Takeda, Y. Funakoshi, N. Iino, H. Shimokawa, K. Egashira and A. Takeshita (2001). **Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(11): 1759-63.

- Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. (1999). **Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries.** *Circulation.* 99(3):392-9.
- Ülker, S., McKeown, P.P., Bayraktutan, U. (2003). **Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities.** *Hypertension* 41:534-539.
- Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. (2004). **Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24(8):1374-1383.
- van Wersch JW. (1993). **A chromogenic assay for coagulation factor VII: analytical performance characteristics and application in several diseases.** *Int J Clin Lab Res;* 23:221±224.
- Vanhoutte PM, Boulanger CM. (1995). **Endothelium-dependent responses in hypertension.** *Hypertens res.* 18:87-98.
- Vanhoutte PM. (2010). **Regeneration of the endothelium in vascular injury.** *Cardiovasc Drugs Ther.* 24(4):299-303.
- Vidwan P, Pathak A, Sheth S, Huang J, Monroe DM, Stouffer GA. (2010). **Activation of protease-activated receptors 3 and 4 accelerates tissue factor-induced thrombin generation on the surface of vascular smooth muscle cells.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30(12):2587-2596.
- von Offenberg Sweeney N, Cummins PM, Birney YA, Redmond EM, Cahill PA. (2004). **Cyclic strain-induced endothelial MMP-2: role in vascular smooth muscle cell migration.** *Biochem Biophys Res Commun.* 320(2):325-33.
- Vu, T. K., D. T. Hung, V. I. Wheaton and S. R. Coughlin (1991). **Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation.** *Cell* 64(6): 1057-68.
- Weiler H, Isermann BH. (2003). **Thrombomodulin.** *J Thromb Haemost.* 1, 1515-24.
- Wernig F, Mayr M, Xu Q. (2003). **Mechanical stretch-induced apoptosis in smooth muscle cells is mediated by beta1-integrin signaling pathways.** *Hypertension.* 41(4):903-11. Epub 2003 Mar 17.
- Wilcox J, Rodriguez J, Subramanian R, Ollerenshaw J, Zhong C, Hayzer D, Horaist C, Hanson S, Lumsden A, Salam T. (1994). **Characterization of thrombin receptor expression during vascular lesion formation.** *Circ Res.*;75:1029 –1038.

- Wilkinson IB, Qasem A, McEniery CM, Webb DJ, Avolio AP, Cockcroft JR. (2002). **Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo.** *Circulation.* 105:213-217
- Wilson, E., Q. Mai, K. Sudhir, R. H. Weiss and H. E. Ives (1993). **Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF.** *J Cell Biol* **123**(3):
- Wolinsky, H. and S. Glagov (1967). **A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals.** *Circ Res* 20(1): 99-111.
- Wozniak, M. A. and C. S. Chen (2009). Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(1): 34-43.
- Wu L, de Champlain J. (1999). **Effects of superoxide on signaling pathways in smooth muscle cells from rats.** *Hypertension.* 34(6):1247-53.
- Yamada, E., Hazama F., Kataoka H., Amano S., Sasahara M., Kayembe K. et Katayama K. (1983). **Elastase-like enzyme in the aorta of spontaneously hypertensive rats.** *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 44(2): 241-5.
- Yamamizu K, Yamashita JK. (2011). **Roles of cyclic adenosine monophosphate signaling in endothelial cell differentiation and arterial-venous specification during vascular development.** *Circ. J.* 75(2):253-260.
- Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M and Fukase M (1976) **Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans.** *Stroke* 7 46–53
- Yamori Y (1989) **Predictive and preventive pathology of cardiovascular diseases.** *Acta Pathol. Japon.* 39 683–705
- Ye J, Liu LW, Esmon CT, Johnson AE. (1992). **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.* 267, 11023-8.
- Young, R-H., Ding Y-A., Lee, Y-M., Yen, M-H. (1995). **Cilazapril reverses endotheliumdependent response to acetylcholine in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats.** *Am J Hypertens* 8:928-933.
- Zucker S., Conner C., DiMassmo B. I., Ende H., Drews M., Seiki M. et Bahou W. F. (1995). **Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis.** *J Biol Chem* **270**(40): 23730-8.

*Liste des figures  
et des tableaux*





---

Figure 1 : Structure du vaisseau sanguin -----	12
Figure 2 : coupe longitudinale de la paroi artérielle -----	12
Figure 3 : Libération de facteurs de relaxation d'origine endothéliale -----	16
Figure 4 : Différenciation et croissance des CML induit par l'étirement-----	20
Figure 5 : Adhésion plaquettaire -----	23
Figure 6 : Activation et agrégation plaquettaire-----	24
Figure 7 : Rôle des surfaces phospholipidiques dans les réactions enzymatiques de la coagulation -----	28
Figure 8 : Phase d'initiation de la coagulation -----	31
Figure 9 : Phases d'amplification et de propagation de la coagulation -----	32
Figure 10 : Les inhibiteurs de la coagulation -----	33
Figure 11 : Mécanisme de l'activation de PAR1 par la thrombine -----	43
Figure 12 : Les divers effets physiologiques et pathologiques de la thrombine sur les cellules vasculaires -----	45
Figure 13 : Préparation de plasma riche en plaquettes et plasma dépourvu en plaquettes -----	59
Figure 14 : Thrombinogramme typique de génération de thrombine représentant les 3 principales phases de la cascade de coagulation -----	61
Figure 15 : Paramètres du thrombinogramme -----	62
Figure 16 : Protocole pour une étude en thrombinographie des cellules en suspension et cellules adhérentes-----	64
Figure 17 : Protocole pour la mesure de l'activité procoagulante des phospholipides -----	66
Figure 18 A : Courbes de génération de thrombine dans le PRP des rats SHR et Wistar-----	75
Figure 18 B : Travail thrombinique réalisé dans le plasma riche en plaquettes ou en plasma dépourvu en plaquettes-----	76
Figure 18 C : Travail thrombinique réalisé dans le plasma riche en plaquettes ou en plasma dépourvu en plaquettes des rats de 5 semaines -----	77
Figure 19 : Travail thrombinique en fonction de la concentration de FT-----	82
Figure 20 A : Effet de la concentration de TFPI sur génération de thrombine dans le plasma du rat Wistar-----	83
Figure 20 B : Effet de la concentration de prothrombine sur le taux de thrombine générée dans le plasma du rat SHR-----	84
Figure 21 : Expression des ARNm de la prothrombine et du facteur FV dans le foie-----	85
Figure 22 : Valeurs d'ETP à la surface des anneaux artériels de carotide, aorte thoracique et abdominale -----	86

Figure 23 A: Travail thrombinique à la surface des anneaux aortiques des rats de 5 semaines -	87
Figure 23 B: Courbes de génération de thrombine à la surface des anneaux aortiques -----	88
Figure 23 C: Travail thrombinique à la surface des anneaux aortiques des rats de 12 semaines	88
Figure 24 A : Courbes représentatives de génération de thrombine à la surface des CE et CML vasculaires adhérentes -----	89
Figure 24 B : Valeurs d'ETP de la génération de thrombine à la surface des CE et CML vasculaires adhérentes -----	90
Figure 25 : Effet du détachement des CML de rats SHR et Wistar par la trypsine sur leur activité PPA -----	91
Figure 26 : Valeurs d'ETP à la surface des CML de rat SHR et Wistar en fonction de la concentration de TF -----	92
Figure 27 : Expression des ARNm des intégrines $\alpha_v$ et $\beta_3$ dans les CML -----	96
Figure 28 : Réponses contractiles de la carotide de rat SHR et Wistar au KCl et FII-----	97
Figure 29 A : Courbes doses réponses à la PE dans la carotide de souris contrôle, SRF <sup>SMKO</sup> et SRF <sup>+</sup> -----	99
Figure 29 B : Courbes doses réponses à l'Ach dans la carotide de souris contrôle, SRF <sup>SMKO</sup> et SRF <sup>+</sup> -----	99
Figure 29 C : Courbes doses-réponses au SNP dans la carotide de souris contrôle, SRF <sup>SMKO</sup> et SRF <sup>+</sup> -----	100
Figure 30 A : Courbes doses réponses à la PE dans la mésentère de souris contrôle, SRF <sup>SMKO</sup> et SRF <sup>+</sup> -----	102
Figure 30 B : Courbes doses réponses à l'Ach dans la mésentère de souris contrôle, SRF <sup>SMKO</sup> et SRF <sup>+</sup> -----	102
Figure 30 C : Courbes doses réponses au SNP dans la mésentère de souris contrôle, SRF <sup>SMKO</sup> et SRF <sup>+</sup> -----	103

---

Tableau I: Les protéines plasmatiques de la coagulation et leurs principaux inhibiteurs -----	27
Tableau II : Concentration et poids moléculaire des principaux facteurs de coagulation murins et leurs inhibiteurs -----	35
Tableau III : La balance hémostatique dans des modèles d'hypertension-----	41
Tableau IV : Les PARs dans le système vasculaire-----	44
Tableau V : numération sanguine des rats SHR et des rats Wistar -----	74
Tableau VI : Paramètres thrombinographiques dans le PRP -----	78
Tableau VII : Paramètres thrombinographiques dans le PDP -----	78
Tableau VIII : Paramètres thrombinographiques dans le PRP chez les rats à 5 semaines -----	79
Tableau IX: Paramètres thrombinographiques dans le PDP chez les rats à 5 semaines -----	79
Tableau X :Concentration des principaux facteurs pro et anticoagulants dans le plasma des rats SHR et rats Wistar à 5 et 12 semaines-----	81
Tableau XI : Paramètres thrombinographiques de la génération de thrombine à la surface des CE et les CML -----	89
Tableau XII : Paramètres thrombinographiques de la génération de thrombine à la surface des CML en présence de PCa et TFPI-----	93
Tableau XIII: Quantité des facteurs pro- et anticoagulants exprimés à la surface des anneaux aortiques et des cellules vasculaires issus des rats SHR et rats Wistar -----	94
Tableau XIV: Les réponses contractiles et de relaxation des carotides de souris contrôle, SRF <sup>SMKO</sup> et SRF <sup>+</sup> -----	98
Tableau XV: Les réponses de contraction et de relaxation dans les artères mésentériques des souris contrôles, SRF <sup>SMKO</sup> et SRF <sup>+</sup> -----	101



*Liste des  
publications*



# **Vascular smooth muscle cells confer a prothrombotic phenotype within the vessel wall of spontaneously hypertensive rats**

Karima Ait Aissa<sup>1,2\*</sup>, Jérémy Lagrange<sup>1,2</sup>, Jean-Pierre Max<sup>1,2</sup>, Huguette Louis<sup>1,2</sup>,  
Simon N. Thornton<sup>1,2</sup>, Athanase Benetos<sup>1,2</sup>, Pascal Challande<sup>3</sup>, Denis Wahl<sup>1,2</sup>,  
Patrick Lacolley<sup>1,2\*</sup>, Veronique Regnault<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, France

<sup>2</sup>Lorraine University, Nancy, France

<sup>3</sup>UPMC Univ Paris 06; CNRS, UMR 7190, Paris, France

Short title: thrombin generation in SHR

Text including references, figures, legends: XXX words

Abstract: XXX words

Total number of figures: 4

Corresponding author: Veronique Regnault, Inserm U961, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel 33 3 83683470, Fax 33 3 83683639; mail: Veronique.Regnault@inserm.fr

## **Abstract**

The hypothesis that hypertension may confer a hypercoagulable state arises from the main complications associated with hypertension, stroke and myocardial infarction. We have demonstrated that pulsatile hemodynamics increase tissue factor pathway inhibitor (TFPI) synthesis by vascular smooth muscle cells (SMCs). Our objective was to determine whether spontaneous hypertension confers changes in the thrombin generating capacity of blood and of the vascular wall. We used spontaneously hypertensive rats (SHR) compared with Wistar rats. Thrombin generation was lower in platelet-rich plasma and platelet-free plasma from SHR compared to Wistar. This was related to lower tissue factor (TF) and prothrombin as well as higher TFPI levels in SHR plasma. In contrast, the addition of thoracic aorta rings of SHR to a Wistar plasma pool resulted in a higher increase in thrombin generation compared to the addition of equivalent rings from Wistar. Whereas no difference was observed for endothelial cells, thrombin formation was higher at the surface of cultured SHR aortic SMCs than from Wistar. Exposure of negatively-charged phospholipids was higher on SHR than on Wistar rings as well as on SMCs. TF and TFPI activities were higher in SHR SMCs. These results show opposite thrombin generating capacity of plasma and vessel walls in SHR compared to Wistar. The higher prothrombotic phenotype of the SHR vessel wall was due to the ability of SMCs to support thrombin generation. These findings suggest that the hypertension-induced membrane phospholipid reorganization and synthesis of procoagulant molecules in SMCs provide substrates for increased thrombin formation within the vessel wall.

**Key words:** spontaneously hypertensive rat; thrombin generation; tissue factor; smooth muscle cells;



## **Introduction**

It is still unclear whether hypertension confers a prothrombotic state in blood and within the vessel wall, although compelling clinical and experimental evidence point towards an impairment of the hemostatic balance in blood conferred by changes in individual coagulation factors in the presence of elevated blood pressure. In support of a hypercoagulable state, a few clinical studies have reported higher plasma levels of clotting factor VII, fibrinogen, and fibrin D-dimer in hypertensive patients than in normotensive subjects.<sup>1-3</sup> Parallel increases in antithrombin (AT) and protein C suggest rather the opposite view, that hypertension may promote anticoagulant systems. In spontaneously hypertensive rats (SHR), in deoxycorticosteron acetate-induced hypertensive rats and an endothelial dysfunction-induced experimental hypertension, a hypercoagulable state was demonstrated by elevated levels of thrombin-antithrombin complex (TAT) as well as D-dimer and supported by an increase in tissue factor (TF)<sup>4</sup> and a decrease in thrombomodulin.<sup>5</sup> Increases in plasma levels of fibrinogen and in prothrombin (factor II) have also been proposed in SHR to promote coagulation despite the increase in AT.<sup>6</sup> In stroke-prone SHR the reduction of factor Xa (FXa) activity and in prothrombin time may attenuate the activation of blood coagulation.<sup>7</sup> In experimental models of hypertension the direct contribution of vascular cells to coagulation has been yet poorly documented. Early works have primarily focused on the increased vascular expression of TF and anti-fibrinolytic molecules.<sup>4</sup>

One concern is that the function of the complex thrombin generation process is difficult to assess from estimates of its separate contributing elements. It would be preferable to estimate the over-all activity of the haemostatic and thrombotic system and its relation with vascular function. This can be attempted by using a global *in vitro* test, such as the calibrated automated thrombogram, designed to explore the thrombin generation process under conditions as close as possible to those *in vivo*. This test has been shown to indicate a

thrombotic tendency in several clinical settings<sup>8-11</sup> and to be an independent predictor of acute ischemic stroke.<sup>12</sup>

The vascular wall is one of the elements that determines the thrombotic response.<sup>13</sup> Prior studies have shed light on the ability of vascular wall cells to support TF-induced thrombin generation.<sup>14-16</sup> We have recently demonstrated an increase in tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and its secretion by cultured vascular smooth muscle cells (SMCs) in response to cyclic stress.<sup>17</sup> It can be surmised that TFPI increases as vascular wall function deteriorates in order to compensate for a putative increase in its procoagulant potency.

The present study tests in SHR the hypothesis that changes in coagulation proteins causes an increased thrombin generating capacity both in the blood and within the vascular wall since SMCs phenotypic modulation is a hallmark of hypertension,

## **Methods**

### ***Animals***

Twelve-week-old, male SHR and Wistar rats (349±8 and 273±4 g respectively) were obtained from Charles River (France). All of the experiments complied with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals by the National Institutes of Health procedures approved by the Animal Ethics Committee of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

### ***Aortic rings and cells***

The descending thoracic aorta was excised from rats after isoflurane anesthesia (4.5% in 1.5 L/min dioxygen) and exsanguination. Two-millimeter ring segments were prepared from a first set of 10 SHR and 10 Wistar rats and washed for 1 hour at 4°C with 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7.35 containing 5 g/L albumin (HBS) and then used for thrombin generation assays or phospholipid procoagulant activity. Aortic SMCs and ECs were isolated from a

second set of 8 SHR and 8 Wistar rats as previously described.<sup>18</sup> SMCs were grown in DMEM/F12 supplemented with 10% foetal bovine serum and ECs in Clonetics® EGM®-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% horse serum. For thrombin generation assays, SMCs at passages 3-5 or ECs at passage 2 were seeded (7500cells/well) in 96-well tissue culture flat-bottom plates (MICROTEST™96), grown to subconfluence and washed with HBS before use.

### ***Blood collection and plasma preparation***

Rats were anesthetized with isoflurane and whole blood was collected via a carotid catheter into syringes containing one-tenth volume 0.106 M sodium citrate. Blood was centrifuged at 194g for 10 minutes at room temperature to obtain platelet-rich plasma (PRP) and then at 1750g for 10 minutes to obtain platelet-poor plasma. PRP was adjusted to  $500 \times 10^9$  platelets/L by addition of autologous platelet-poor plasma. Platelet-free plasma (PFP) was obtained by centrifugation of PPP at 13000g for 30 minutes at 4°C, aliquoted, and frozen at -80°C.

### ***Hematologic analyses***

Complete blood counts and hematocrit were determined with an automatic cell counter (Micros 60 ABX model, Montpellier, France). Coagulation factor II was measured in rat plasma samples diluted 1:40-80 in factor diluent (Instrumentation Laboratory, Le Pré Saint Garvais, France). For each assay 50 µL of diluted sample were added to 50 µL of human factor II-deficient plasma (Siemens Healthcare Diagnostics SAS, Saint-Denis, France). After 1 min of incubation at 37°C in a KC10 coagulometer, coagulation was started by addition of 80 µL of Thromborel® S. Calibration curves were generated using the reference plasma Unicalibrator (Diagnostica Stago, Asnières, France). AT levels were measured with the Coamatic® antithrombin test kit from Chromogenix, and thrombin-antithrombin complex with the Enzygnost® TAT micro (Instrumentation Laboratory).

### ***Thrombin generation assays***

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) as previously reported.<sup>19, 20</sup> Coagulation was triggered by recalcification in the presence of recombinant human TF (Dade Behring, Marburg, Germany). Round-bottom 96-well Greiner blue plates were used for PRP and PFP, and MICROTTEST™96 plates for SMC or EC monolayers. For measurements in PFP, a mixture of phosphatidyl-serine (PS), phosphatidyl-ethanolamine (PE) and phosphatidyl-choline (PC) (20:20:60 mole%) at a final concentration of 4 µM, or aortic rings, were added. Thrombin generation curves were recorded in triplicate and the endogenous thrombin potential (ETP) was assessed as the area under the curve.

#### ***Phospholipid Procoagulant Activity***

The chromogenic assay measuring the phospholipid-related procoagulant activity (PPA) in aortic rings was performed as described previously for plasma.<sup>21, 22</sup> Rings resuspended in 50 µL of 50 mM Tris, 175 mM NaCl, pH 7.9 (TBS) containing 2 g/L bovine serum albumin (BSA) were added to wells containing 50 µL of FXa (1.2 nM), factor Va (FVa) (2.4 nM), CaCl<sub>2</sub> (15 mM) and 50 µL of bovine prothrombin (6 µM) plus S2238 substrate (0.6 mM). The absorbance change was read at 405 nm at 37°C. For SMC and EC monolayers, washed adherent cells were incubated with 50 µL of TBS-BSA, 50 µL of FXa-FVa-CaCl<sub>2</sub> and 50 µL of bovine prothrombin (6 µM) plus Z-Gly-Gly-Arg-AMC substrate (1.25 mM) in 20 mM HEPES pH 7.5 containing 60 g/L BSA. The plate was placed in the Fluoroskan Ascent fluorometer and allowed to warm to 37°C for 5 min before kinetic readings were taken over 10 min. Phospholipid concentration was estimated from the initial rate of thrombin formation by reference to a standard curve constructed with a mixture of PS/PE/PC (20:20:60 mole%), and expressed as PS equivalents.

#### *Tissue factor and TFPI activity assays*

TF and TFPI activities were measured in plasma, and in 200  $\mu$ L HBS incubated for 1 hour at room temperature with aortic ring using the Actichrome® tissue factor and Actichrome® TFPI activity assay respectively (American Diagnostica, Stamford, CT). To measure cell surface TF or TFPI activity, washed adherent SMCs or ECs were overlaid with equivalent volumes (75 and 20  $\mu$ L of HBS respectively) as those of plasma. The reaction was stopped with 50  $\mu$ L of glacial acetic acid and the absorbance was read at 405 nm.

### ***Real-Time Quantitative RT-PCR analysis***

Frozen liver sections were disrupted in liquid nitrogen until a fine powder was obtained. Samples were homogenized with TRIzol® reagent (Invitrogen™ Life Technologies, Saint Aubin, France) and total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA integrity and concentration were assessed using a Nanodrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). First-strand cDNA was synthesized according to the manufacturer's instructions (Fermentas, Courtaboeuf, France). Real-time quantitative PCR was performed using the MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System with iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). All experiments were performed in triplicate and differences in cDNA input were compensated by normalization to expression of *Hprt1*.<sup>23,24</sup> Primer sequences are listed in the online-only Data Supplement.

### ***Immunohistochemistry***

Please see online-only Data Supplement.

### ***Statistical analysis***

Results are expressed as means $\pm$ SEM. Comparisons between groups were performed using the Wilcoxon rank test. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## **Results**

### ***Hypertension-associated changes in hematologic parameters***

Red cell count, hematocrit, hemoglobin, platelet and mean platelet volume were higher in the SHR rats as compared with the Wistar rats (Table 1). Differences were also observed for several parameters of blood coagulation. Plasma levels of prothrombin and TF activity were significantly lower while TFPI activity was higher in SHRs than in Wistar rats. Similar levels of antithrombin were measured in the two groups of rats. Although TAT tended to be lower in the SHR group no significant difference was observed. Livers from SHR showed lower levels of prothrombin (vitamin K-dependent factor) and FV (whose synthesis is independent of vitamin K) mRNA ( $F2/Hprt1$  mRNA ratio =  $1.3 \pm 0.1$  versus  $1.8 \pm 0.2$ ,  $P=0.038$ , and  $F5/Hprt1$  mRNA ratio =  $1.8 \pm 0.2$  versus  $3.6 \pm 0.4$ ,  $P=0.008$ ;  $n=9$  in each group).

### ***In vitro thrombin generation in plasma***

When the thrombin-forming capacity of blood was examined by an overall function test, significant lower thrombin generating capacity was observed in SHR plasma compared with Wistar plasma. Figure 1A shows a typical thrombin generation profile in PRP triggered with low concentration of tissue factor. The thrombin burst was delayed and the peak height was lower in SHR plasma. Lower levels of TF-induced thrombin generation were observed both in SHR PRP and PFP, whatever the concentration of TF used to trigger coagulation (Figure 1B). As expected, at low TF concentrations thrombin generation was enhanced in the presence of cell surfaces (platelets) compared with synthetic phospholipids (PS/PE/PC mixture). Figure 2 shows that addition of purified TFPI to Wistar plasma induced a concentration-dependent decrease in ETP whereas addition of purified prothrombin to SHR plasma had the opposite effect.

### ***Aortic rings from SHR display higher thrombin generating capacity than Wistar rings***

Addition of aortic rings to a Wistar rat plasma pool increased significantly ETP values when compared with 50 pM TF alone (a concentration chosen to be close to levels of TF expressed by rings). This procoagulant activity was greater for SHR than for Wistar rings (Figure 3). Analysis of the kinetics of thrombin formation and inactivation revealed a marked difference in peak height (Figure 3A). When compared with Wistar rings, the higher procoagulant phenotype of SHR aortic rings seemed to be unrelated to the expression of TF or TFPI activity since SHR rings expressed a rather lower functional TF and a significantly higher TFPI activity than Wistar rings. However, the exposure of negatively charged phospholipids was about 2-fold higher on SHR than on Wistar rings (Table 2).

***Smooth muscle cells are responsible for the procoagulant phenotype of aortic rings***

When compared with ECs (CD31 and von Willebrand-positive cells), SMCs (smooth muscle actin-positive cells), whatever their origin (SHR or Wistar), displayed a greater ability to support thrombin generation. Figure 4A shows typical thrombin generation curves obtained with adherent SMCs and ECs in the presence of a Wistar PFP pool. The times to thrombin burst and peak were significantly shortened and the peak, velocity index and ETP values (figure 4B), were higher with SMCs compared with ECs. Whereas no differences were observed in the thrombin generation patterns and parameters between SHR and Wistar ECs, higher thrombin peak and ETP were obtained with SHR SMCs compared with Wistar SMCs. Measurement of the negatively-charged membrane phospholipids revealed higher PS exposure on SHR than on Wistar SMCs (Table 2). For both SHR and Wistar rats, TF activity was about 20-fold higher in SMCs compared with ECs. SMC expression of TF and TFPI were higher in SHR than in Wistar while no differences were observed for ECs between the two strains.

## **Discussion**

This study has demonstrated lower thrombin generation in SHR plasma related to decreased prothrombin and increased TFPI, which contrasts with higher thrombin generation on aortic wall conferred by procoagulant activities of SMCs.

Hypercoagulability in plasma can be investigated either by plasma markers of *in vivo* activation of coagulation or by the reactivity of the clotting system. The latter was assessed by the amount of thrombin that can be formed *in vitro* in response to a defined stimulus, while the former reflects thrombin generation *in vivo* and depends on both that reactivity and intermittent triggers of various intensities. This is a reason why measurement of thrombin generation *in vitro* may prove to be more reliable than *in vivo* markers. Whereas TAT levels were found previously to be elevated in SHR<sup>5</sup> but not in stroke-prone SHR<sup>7</sup> compared with Wistar-Kyoto plasma, in the present study TAT were lower in SHR compared to Wistar although the difference was not statistically significant. These data are consistent with hyporeactivity of the clotting system in SHR as shown by thrombography taking into account changes in both procoagulant and anticoagulant properties, thus representing a relevant slide of the overall hemostatic function.

The hypocoagulable phenotype in SHR plasma was unlikely to be influenced by platelets since similar results were obtained in PRP and PFP. In addition, the increased platelet count and mean platelet volume was inconsistent with lower thrombin formation. Our experimental conditions, i.e. centrifugation of platelet-poor plasma at 13000g, allowed removal of most of the circulating cell-derived microparticles. Thus our finding of lower thrombin generation in SHR plasma is due to plasmatic coagulation factors. The lower plasma levels of TF, which is the initiator of the coagulation cascade, could represent a mechanism of decreased thrombin formation in SHR. Our results showing similar differences in ETP values between SHR and Wistar at low TF concentrations presumably close to the physiological range and at very high



TF concentration preclude a prominent role of TF in the lower thrombin generation in SHR plasma. Prothrombin, AT and free TFPI have been identified as major determinants of ETP values.<sup>25, 26</sup> Opposite variations in prothrombin (decreased) and TFPI (increased) in our study between SHR and Wistar rats may have contributed to ETP changes. Indeed, the marked increase in ETP induced by addition of extra (purified) prothrombin to SHR further supports the role of prothrombin concentration as the limiting factor in this rat. Alternatively, addition of TFPI to Wistar plasma induced a marked reduction of ETP argued for a role of vascular TFPI in damping thrombin generation. It is unlikely that low plasma concentrations of prothrombin were due to consumptive blood coagulation since TAT levels were not elevated. Rather, our finding that hepatic mRNA expression of prothrombin was lower in SHR than in Wistar strongly suggests impairment in prothrombin synthesis. The parallel lower level of hepatic FV mRNA in SHR rules out a functional vitamin K deficiency but rather argue for an early liver function impairment in relation with cardiac hypertrophy.

Our observation of a higher level of TFPI secreted by aortic rings from SHR compared to aortic rings from Wistar rats leads us to consider that vascular cells are involved in the hyporeactivity of the clotting system in SHR plasma. Human SMCs and ECs synthesize constitutively equivalent levels of TFPI.<sup>27</sup> To further evaluate this specific contribution of the vessel wall to plasma thrombin generation, aortic rings from SHR or Wistar were added to the same pool of plasma. Contrary to our expectations, we found that addition of SHR aortic rings to plasma conferred a hypercoagulable state compared to Wistar rings. Our data demonstrate that ETP values in plasma were higher when adherent SHR rather than Wistar SMCs are used as cellular surfaces whereas no difference exist for ECs, suggesting a major contribution of SMCs in the coagulation phenotype of the arterial tissue. In addition we found that SMCs support higher thrombin generation than ECs as reported previously.<sup>14</sup>

The role of cells in coagulation is primarily to provide a negatively-charged phospholipid surface for the assembly of all steps of the coagulation cascade. Exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of platelets<sup>28</sup> and vascular cells<sup>14, 15</sup> regulated by a flip-flop mechanism has been emphasized to account for the procoagulant nature of cells. Our finding showing increased amounts of PPA in aortic rings and SMCs from SHR provide a rationale to explain increased thrombin generation in SHR related to higher SMC negatively charged phospholipids. The mechanisms for the increased levels of PPA in SMCs from SHR may be related to hypertension-induced elevation of intracellular calcium<sup>29</sup> promoting the flip-flop process<sup>30</sup> and the structural reorganisation of cellular membranes in SHR.

Thrombin generation is initiated by TF and the aortic layer represents a source of increased TF in hypertension.<sup>4</sup> Compared with Wistar, we observed in SHR higher levels of TF associated with SMCs but similar low levels on ECs. The high level of TF activity on adherent cultured SMCs contrasts with the low level of TFPI activity. Since TFPI is known to dampen the burst of thrombin in response to a small procoagulant stimulus,<sup>31</sup> it is unlikely that TFPI plays a major down-regulating role in thrombin generation on SMCs in both strains. There is increasing evidence that specific binding proteins on membranes regulate the formation of coagulation complexes by localizing coagulation factors to cellular surfaces.<sup>28</sup> It has been reported previously increased integrin  $\alpha_v\beta_3$  in the vessel wall of SHR.<sup>32</sup> Since this integrin is the receptor for prothrombin in SMCs,<sup>33</sup> we can anticipate a synergistic effect between anionic phospholipid membranes, TF and integrin  $\alpha_v\beta_3$  on thrombin generation in SHR vascular wall.

### **Perspectives**

While thrombogenesis in hypertension has been shown to be mediated by endothelial dysfunction and platelet activation, increased thrombin generation has also been reported as a potential mechanism. The results of this study indicate that in spontaneously hypertensive

rats thrombin generation may also be increased by smooth vascular smooth muscle cells even when thrombin generation in plasma is not increased. Increased thrombin generation due to smooth muscles cells may also have cellular effects wall in particular mitogenic effects on smooth muscle cells and endothelial cells. The potential benefit of direct thrombin inhibitors should be investigated both on hemostatic balance and the cellular phenotypic modulation in hypertension and thrombotic related diseases.

### **Sources of funding**

This work was supported by the “Region Lorraine” and the Communauté Urbaine du Grand Nancy.

### **Disclosures**

None.

### **References**

1. Arikan E, Sen S. Endothelial damage and hemostatic markers in patients with uncomplicated mild-to-moderate hypertension and relationship with risk factors. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2005;11:147-159.
2. Junker R, Heinrich J, Schulte H, Erren M, Assmann G. Hemostasis in normotensive and hypertensive men: results of the PROCAM study. The prospective cardiovascular Munster study. *J Hypertens.* 1998;16:917-923.
3. Lip GY, Li-Saw-Hee FL. Does hypertension confer a hypercoagulable state? *J Hypertens.* 1998;16:913-916.
4. Corseaux D, Ollivier V, Fontaine V, Huisse MG, Philippe M, Louedec L, Vranckx R, Ravanat C, Lanza F, Angles-Cano E, Guillin MC, Michel JB. Hemostasis imbalance in experimental hypertension. *Mol Med.* 2002;8:169-178.

5. Sawada K, Naiki M, Yago H, Matsushita K, Ohtsuki T, Kitagawa K, Matsumoto M, Hori M. Hypertension associated with reduced plasma thrombomodulin levels and a hypercoagulable state in rats. *Clin Exp Hypertens*. 2003;25:73-84.
6. Gomibuchi H, Okazaki M, Iwai S, Kumai T, Kobayashi S, Oguchi K. Development of hyperfibrinogenemia in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats: a potentially useful animal model as a complication of hypertension and hyperlipidemia. *Exp Anim*. 2007;56:1-10.
7. Abumiya T, Sakata T, Enyoji K, Kato H, Kawai J, Suzuki T, Masuda J, Sasaguri T, Ogata J. Does hypertension confer a hypercoagulable state in stroke-prone spontaneously hypertensive rats? *J Hypertens*. 2000;18:901-909.
8. Besser M, Baglin C, Luddington R, van Hylckama Vlieg A, Baglin T. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *J Thromb Haemost*. 2008;6:1720-1725.
9. Dargaud Y, Trzeciak MC, Bordet JC, Ninet J, Negrier C. Use of calibrated automated thrombinography +/- thrombomodulin to recognise the prothrombotic phenotype. *Thromb Haemost*. 2006;96:562-567.
10. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA*. 2006;296:397-402.
11. Lecompte T, Wahl D, Perret-Guillaume C, Hemker HC, Lacolley P, Regnault V. Hypercoagulability resulting from opposite effects of lupus anticoagulants is associated strongly with thrombotic risk. *Haematologica*. 2007;92:714-715.
12. Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, Spaft C, Ducimetiere P, Ritchie K, Dartigues JF, Scarabin PY. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic

- stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1445-1451.
13. Esmon CT, Esmon NL. The link between vascular features and thrombosis. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:503-514.
  14. 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.
  15. Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood.* 1997;89:4378-4384.
  16. 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.
  17. 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.
  18. Battle T, Arnal JF, Challah M, Michel JB. Selective isolation of rat aortic wall layers and their cell types in culture--application to converting enzyme activity measurement. *Tissue Cell.* 1994;26:943-955.
  19. 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.
  20. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res.* 2004;114:539-545.

21. 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.
22. Wagenvoord RJ, Hendrix HH, Kai H, Hemker HC. A chromogenic test to determine the procoagulant phospholipids in platelet-rich plasma and whole blood. *Thromb Haemost*. 1994;72:582-587.
23. Seol D, Choe H, Zheng H, Jang K, Ramakrishnan PS, Lim TH, Martin JA. Selection of reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in organ culture of the rat and rabbit intervertebral disc. *BMC Res Notes*. 2011;4:162.
24. Xing W, Deng M, Zhang J, Huang H, Dirsch O, Dahmen U. Quantitative evaluation and selection of reference genes in a rat model of extended liver resection. *J Biomol Tech*. 2009;20:109-115.
25. Dielis AW, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Hamulyak K, Ten Cate H, Rosing J. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J Thromb Haemost*. 2008;6:125-131.
26. Nieuwenhuys CM, Feijge MA, Beguin S, Heemskerk JW. Monitoring hypocoagulant conditions in rat plasma: factors determining the endogenous thrombin potential of tissue factor-activated plasma. *Thromb Haemost*. 2000;84:1045-1051.
27. Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, Peterson TE, Broze GJ, Jr., Simari RD. Expression of tissue factor pathway inhibitor in vascular smooth muscle cells and its regulation by growth factors. *Circ Res*. 1998;83:1264-1270.
28. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1381-1389.
29. Touyz RM, El Mabrouk M, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-

- mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1999;84:505-515.
30. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:15-26.
  31. Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:233-242.
  32. Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation.* 1999;100:2267-2275.
  33. 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.

### **Figure legends**

- Figure 1. *Thrombin generation in plasma.* Representative thrombin generation curves (A) and endogenous thrombin potential (ETP) values (B) in platelet-rich plasma (PRP) adjusted to  $500 \times 10^9$  platelets/L or in platelet-poor plasma (PFP) + 4  $\mu$ M PS/PE/PC vesicles. Coagulation was triggered with either low (0.5 pM) or high (50 pM) concentrations of tissue factor (TF). Results are means  $\pm$  SEM of 8 to 13 different plasmas tested in triplicate; \*  $P < 0.05$  vs Wistar; †  $P < 0.05$  vs PRP as the same PT concentration.
- Figure 2. *Dependence of thrombin generation on TFPI and prothrombin levels.* Either purified recombinant human TFPI was added to Wistar PFP (A) or purified bovine prothrombin to SHR PFP (B), and thrombin generation was triggered by 0.5 pM of tissue factor in the presence of 4  $\mu$ M PS/PE/PC vesicles as the phospholipid surface. Results (means  $\pm$  SEM of 5 experiments) are expressed as ratios of values obtained with each PFP alone. \*  $P < 0.05$  vs a ratio value of 1.
- Figure 3. *Thrombin generation in the presence of aortic rings.* Representative thrombin generation curves (A) and endogenous thrombin potential (ETP) values (B) in a Wistar PFP pool triggered with 50 pM TF (PFP+TF) or with 2 mm rings from SHR or Wistar thoracic aortae. Results are means  $\pm$  SEM of 8 experiments with rings from different rats; \*  $P < 0.05$  vs Wistar; †  $P < 0.05$  vs PFP+TF.



Figure 4. *Thrombin generation at the surfaces of SHR or Wistar SMCs and ECs.* Representative thrombin generation curves (A) and endogenous thrombin potential (ETP) values (B) in a Wistar PFP pool added to washed SMC or EC monolayers. Results are means  $\pm$  SEM of 12 experiments; \*  $P < 0.05$  vs Wistar.

**Table 1. Hematologic analysis**

	Wistar	SHR
<b><i>Blood cell count</i></b>		
Red blood cells ( $\times 10^{12}/L$ )	6.0 $\pm$ 0.2	7.3 $\pm$ 0.03 *
White blood cells ( $\times 10^9/L$ )	3.2 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.1
Platelets ( $\times 10^9/L$ )	429 $\pm$ 21	527 $\pm$ 14 *
Hematocrit (%)	32.2 $\pm$ 0.9	36.6 $\pm$ 0.3 *
Hemoglobin (g/dL)	11.6 $\pm$ 0.3	12.8 $\pm$ 0.1 *
Mean platelet volume (fL)	6.6 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.2 *
<b><i>Plasma levels of hemostatic factors</i></b>		
TF (pmoles/L)	3.7 $\pm$ 0.8	1.2 $\pm$ 0.3 *
TFPI (U/mL)	4.5 $\pm$ 0.4	6.9 $\pm$ 0.2 *
Prothrombin (%)	83 $\pm$ 4	58 $\pm$ 4 *
Antithrombin (%)	107 $\pm$ 7	100 $\pm$ 4
TAT complexes (ng/mL)	74 $\pm$ 17	49 $\pm$ 15

TF, tissue factor; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; TAT, thrombin antithrombin

Values are means  $\pm$  SEM of 10 rats. \*  $P < 0.05$  vs Wistar.

**Table 2. Vascular levels of hemostatic factors**

	Wistar	SHR
<b><i>Aortic rings</i></b>		
TF (pmoles/L)	93±8	76±9
TFPI (U/mL)	0.10±0.01	0.14±0.01 *
PPA (nM equivalent PS / g of ring)	1.9±0.2	3.4±0.4 *
<b><i>Aortic smooth muscle cells</i></b>		
TF (pmoles/L)	29±2	37±2 *
TFPI (U/mL)	0.009±0.002	0.038±0.004 *
PPA (nM equivalent PS / mL)	649±22	747±33 *
<b><i>Aortic endothelial cells</i></b>		
TF (pmoles/L)	1.5±0.2	1.8±0.5
TFPI U/mL)	0.020±0.002	0.020±0.001

TF, tissue factor; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; PPA, phospholipid procoagulant activity; PS, phosphatidylserine

Values are means ± SEM of 10 rats. \*  $P < 0.05$  vs Wistar.

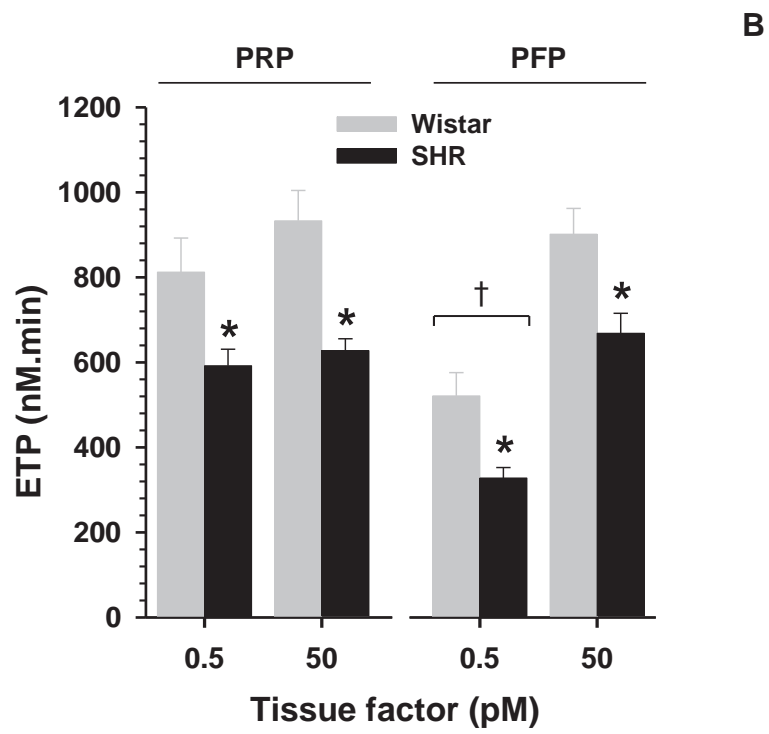
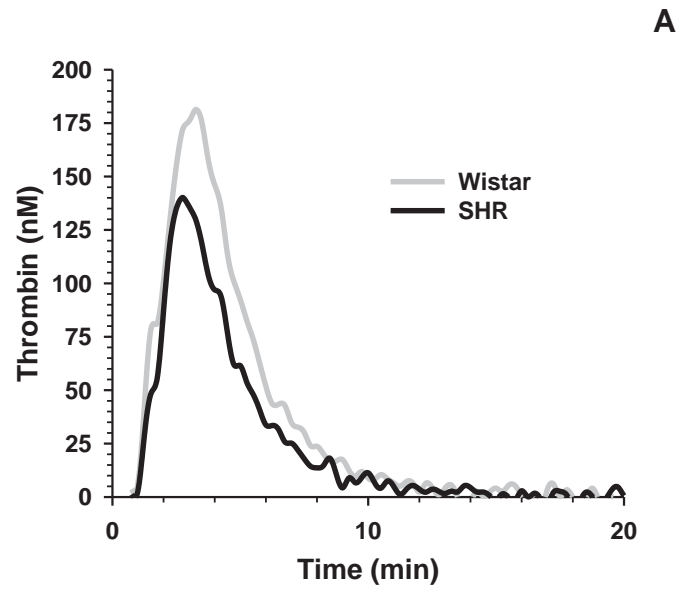
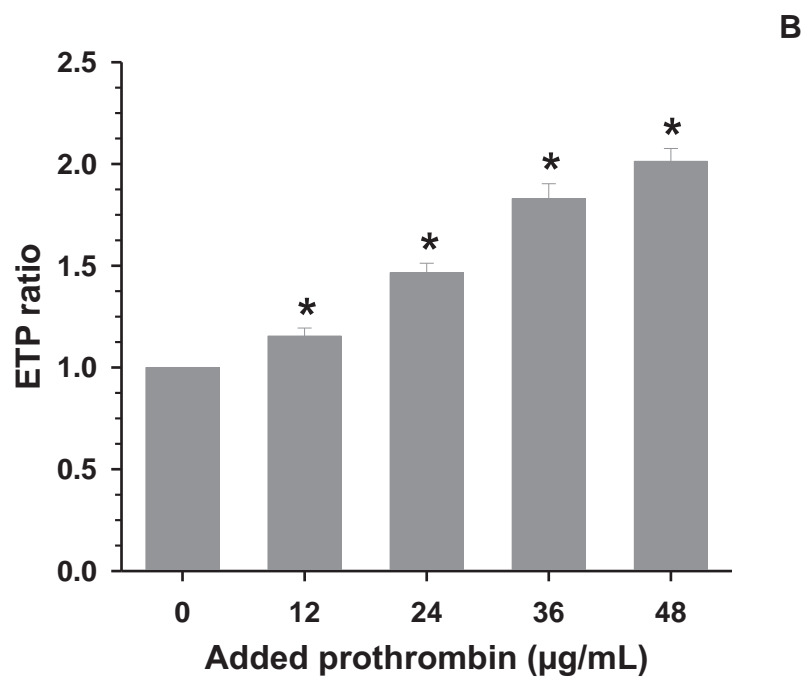
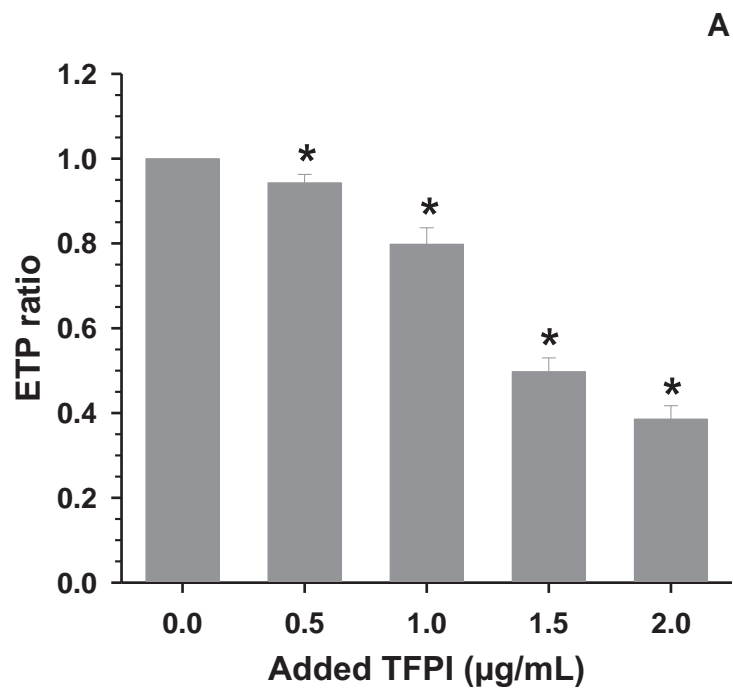
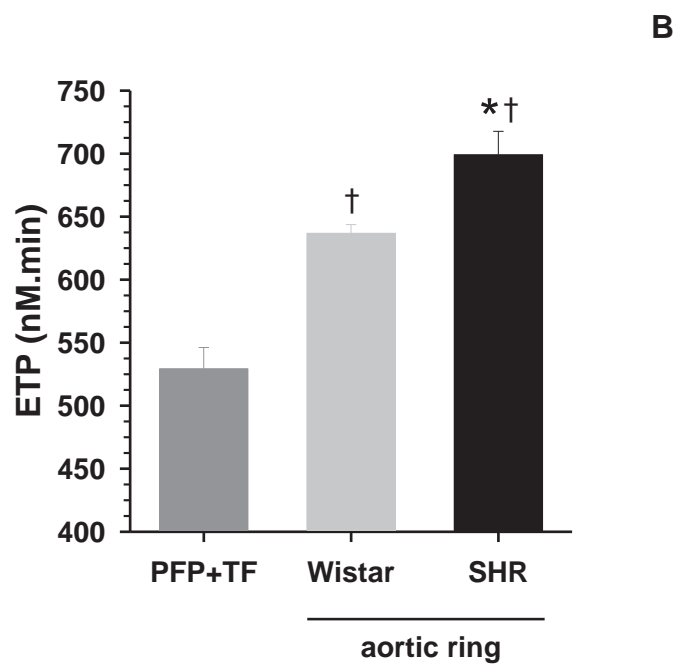
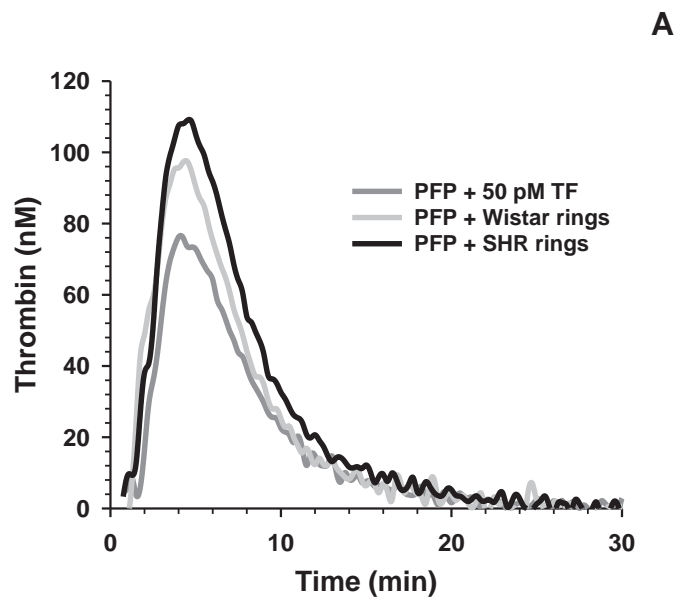


Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**

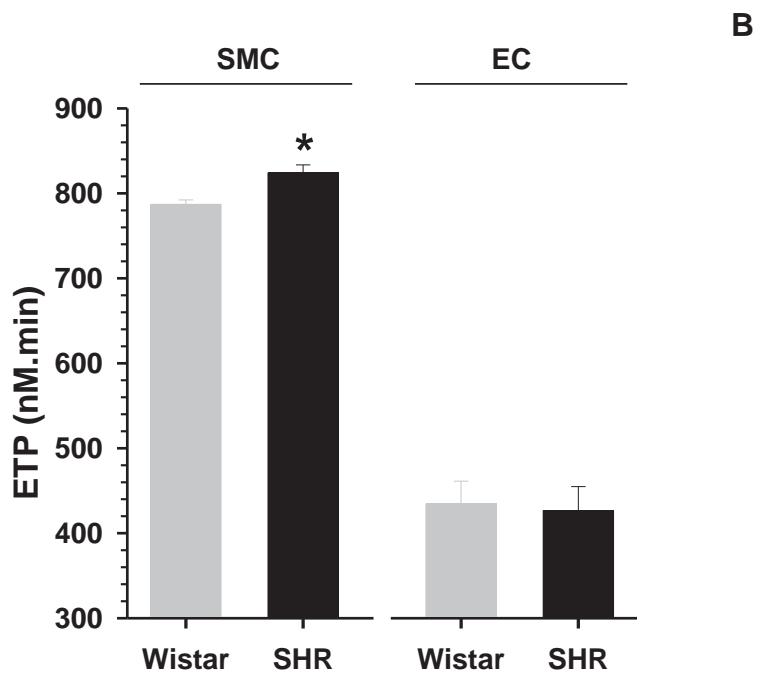
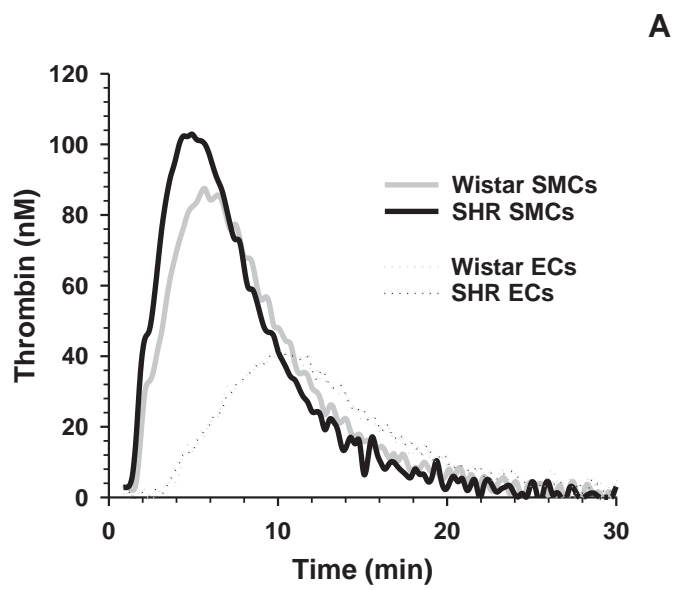


Figure 4

		<b>Wistar</b>	<b>SHR</b>
<i>Anneaux aortiques</i>	TF (pmoles/L)	93±8	76±9
	TFPI (U/mL)	0.10±0.01	0.14±0.01 *
	PPA (nM équivalent PS/g d'anneau)	1.9±0.2	3.4±0.4 *
<i>CML aortiques</i>	TF (pmoles/L)	29±2	37±2 *
	TFPI (U/mL)	0.009±0.002	0.038±0.004 *
	PPA (nM équivalent PS / mL)	649±22	747±33 *
<i>CE aortiques</i>	TF (pmoles/L)	1.5±0.2	1.8±0.5
	TFPI U/mL)	0.020±0.002	0.020±0.001



## SPECIAL ARTICLE

# Thrombin generation in antiphospholipid syndrome

S Zully<sup>1,2,3,\*</sup>, K Ait Aissa<sup>1,\*</sup>, A Membre, V Regnault<sup>1</sup>, T Lecompte<sup>1,2,3,4</sup> and D Wahl<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U961, Vandœuvre-lès-Nancy, France; <sup>2</sup>Université de Lorraine, France; <sup>3</sup>CHU Nancy, Competence Center for Systemic Autoimmune Diseases and Division of Vascular Medicine, Vandœuvre-lès-Nancy, France; and <sup>4</sup>Hematology Geneva, Switzerland

Our objective was to study acquired Activated Protein C (APC) resistance in patients with antiphospholipid antibodies (aPL) using a thrombin generation based assay. We compared patients with and without lupus (systemic lupus erythematosus, SLE). A parameter summarizing APC inhibition of thrombin generation with increasing APC concentrations (IC<sub>50</sub>-APC) was increased in all patient groups compared to controls; median values were 15.3 (interquartile range, IQR, 9.7 to 34.0) in patients with primary antiphospholipid syndrome (APS), 27.3 (IQR 23.5 to 43.5) in patients with SLE without APS, 64.1 (IQR 25.9 to 65.0) in patients with SLE/APS compared to 10.4 [IQR 8.5 to 15.8] in controls, respectively  $p=0.003$ ,  $p=0.0001$  and  $p=0.0001$ .

In conclusion, patients with SLE and primary APS displayed a hypercoagulable state characterized by APC resistance. *Lupus* (2012) 21, 758–760.

**Key words:** Antiphospholipid antibody; antiphospholipid syndrome; lupus anticoagulant; anticardiolipin antibody; thrombin generation

## Introduction

Several clinical studies have shown that acquired Activated Protein C (APC) resistance<sup>1,2</sup> is associated with thrombotic events in patients with antiphospholipid antibodies.<sup>3,4</sup>

Our objective was to investigate the characteristics of APC resistance and the factors contributing to this hypercoagulable state in patients with antiphospholipid antibodies (aPL). We also compared APC resistance in patients with and without systemic lupus erythematosus (SLE).

## Materials and methods

### Study population

The study design was a prospective study of all consecutive patients who were persistently positive

for aPL but who were not on anticoagulant therapy. The patients were referred to our outpatient clinics and gave their informed consent. The study protocol was approved by the regional ethics board. We included 91 patients and 39 controls. Forty-eight patients had antiphospholipid syndrome, either primary APS ( $n=38$ ) or SLE and APS ( $n=10$ ) with thrombotic or obstetrical manifestations, 13 had SLE without aPL, 24 aPL without APS and six SLE and aPL without APS.

### Blood collection and plasma preparation

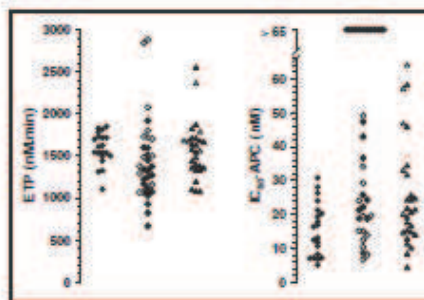
Venous blood was drawn into Monovette® (Sarstedt) syringes containing 1/10 volume of 0.106 M sodium citrate. Platelet Rich Plasma (PRP) was prepared by centrifugation at 190g for 10 minutes at 20°C. The platelet count was adjusted to  $150 \times 10^9$  platelets/L in all but two thrombocytopenic aPL patients (patient 1 and patient 4, platelet count in PRP of only 60 and  $116 \times 10^9$ /L respectively) by addition of autologous Platelet Poor Plasma (PPP), which was obtained by centrifugation at 1750g for 10 minutes. A part of the PPP was centrifuged at 13,000g for 30 minutes at 4°C in order to discard endogenous microvesicles (PPP 13,000g). The PPP 13,000g was stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

\*These authors contributed equally to this project and should be considered co-first authors

Correspondence to: Denis Wahl, Centre de Compétence Régional des Maladies Vasculaires Rares et Systémiques et Auto-immunes, Institut Lorrain du Cœur et des Vaisseaux Louis Mathieu – CHU de Nancy, Rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-Lès-Nancy Cedex, France  
Email: d.wahl@chu-nancy.fr

© The Author(s), 2012. Reprints and permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

10.1177/0961203312443059



**Figure 1** Heterogeneity of in vitro phenotype of the clotting system. The dot plots represent endogenous thrombin potential (ETP) and  $IC_{50}$ -APC values calculated from thrombin generation curves obtained in controls (filled circles), lupus anticoagulant (LA) patients with or without anticardiolipin antibodies (aCL) alone (open diamonds), patients without antiphospholipid antibodies (aPL) heterozygous (filled triangles) and homozygous (open triangles) for factor V Leiden.

#### Thrombin generation curves

Calibrated automated thrombography (CAT) was performed at 37°C as previously described<sup>5</sup> in a microtiter plate fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermolabsystems, Helinski, Finland) using the dedicated software program (Thrombinoscope<sup>®</sup>, Synapse BV, Maastricht, The Netherlands). Briefly, coagulation was triggered by recalcification in the presence of low concentrations of recombinant human tissue factor (Dade Behring, Marburg, Germany). The thrombin generation curve was recorded in PRP, in the absence or in the presence of in-house APC<sup>4,5</sup> at several final concentrations (6.7, 13.9, 25 and 65 nM). The total amount of thrombin activity (i.e. the endogenous thrombin potential, ETP) was assessed as the area under the curve of thrombin as a function of time. A dose-response curve of inhibition of ETP with increasing concentrations of APC was performed and characterized by  $IC_{50}$ -APC: the APC concentration that produced a 50% inhibition of ETP.

#### Statistical analysis

Results are given as the median and interquartile range (IQR). *P* values < 0.05 were considered significant.

#### Results

##### APC resistance is higher in patients with SLE

$IC_{50}$ -APC was increased in all patient groups compared to controls: median values were 15.3

(IQR 9.7 to 34.0) in patients with primary APS, 27.3 (IQR 23.5 to 43.5) in patients with SLE without APS, 64.1 (IQR 25.9 to 65.0) in patients with SLE/APS and 10.4 (IQR 8.5 to 15.8) in controls. The same differences were observed in asymptomatic patients with aPL with or without SLE. In Figure 1 we have shown the heterogeneity of ETP and APC sensitivity in patients and controls. Interestingly, when compared with patients with the factor V Leiden genotype some patients with aPL displayed a stronger resistance to APC as shown by the  $IC_{50}$ -APC values.

#### Discussion

Our results with thrombin generation based tests indicate that patients with APS have a significantly increased resistance to APC and this is even more marked in patients with SLE. The mechanism of acquired APC resistance has been previously addressed by investigating the effect of aPL on the rate of activation of protein C or APC-mediated factor Va and factor VIIIa inactivation.<sup>6,7</sup> This is suggestive of interference of immune complexes with this anticoagulant pathway. Most clinical studies using classical activated partial thromboplastin time (aPTT)-based tests have shown an increased risk for thrombosis in aPL patients with APC resistance. One study also suggested that acquired APC resistance could also be associated with pregnancy losses.<sup>8</sup> In conclusion, using a thrombin generation based APC sensitivity assay we have shown that patients with SLE and primary APS displayed a hypercoagulable state characterized by APC resistance.

#### Acknowledgments

We thank the Coordinators and members of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies for helpful discussions in the London, Barcelona and Padua meetings.

#### Funding

This research received funding from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique PHRC 2005 and Fondation de France (2004004807).

#### Conflict of interest

None declared.

## References

- 1 Esmon NL, Safa O, Smirnov MD, Esmon CT. Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway. *J Autoimmun* 2000; 15: 221-225.
- 2 Wahl D, Membre A, Perret-Guillaume C, Regnault V, Lacompte T. Mechanisms of antiphospholipid-induced thrombotic effects on the protein C system. *Curr Rheumatol Rep* 2009; 11(1): 77-81.
- 3 Male C, Mitchell I, Julian J, *et al.* Acquired activated protein C resistance is associated with lupus anticoagulants and thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Blood* 2001; 97: 844-849.
- 4 Lacompte T, Wahl D, Perret-Guillaume C, Hemker HC, Lacroix P, Regnault V. Hypercoagulability resulting from opposite effects of lupus anticoagulants is associated strongly with thrombotic risk. *Haematologica* 2007; 92: 714-715.
- 5 Regnault V, Bégin S, Wahl D, De Maistre E, Hemker HC, Lacompte T. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 2005; 89: 208-212.
- 6 van Wijnen M, Stam JG, van't Veer C, *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; 76: 397-403.
- 7 Crowther MA, Johnston M, Weitz J, Ginsberg JS. Free protein S deficiency may be found in patients with antiphospholipid antibodies who do not have systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 1996; 76: 689-691.
- 8 Munoz-Rodriguez FJ, Reverter JC, Font J, *et al.* Clinical significance of acquired activated protein C resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2002; 11: 730-735.

**Hypertension, hypercoagulability and the metabolic syndrome: a cluster of risk factors for cardiovascular disease**

Xianqing Mao<sup>1,2</sup>, Karima Ait-Aissa<sup>1,2</sup>, Jeremy Lagrange<sup>1,2</sup>, Gina Youcef<sup>1,2</sup>, Huguette Louis<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>INSERM, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, France

<sup>2</sup>Nancy Université, Nancy, France

Text: 7761 words including references and figure legends

Abstract: 101 words

Table: 1

Figures: 2

Corresponding author: Huguette Louis, Inserm U961, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel 33 3 83683631, Fax 33 383683639; mail: [huguette.louis@nancy.inserm.fr](mailto:huguette.louis@nancy.inserm.fr)

## **Abstract**

Cardiovascular disease (CVD) is one of the main causes of mortality in the world representing around 30% of all deaths. It constitutes also an important factor in morbidity and incapacity. There are several related CVD risk factors such as hypertension, metabolic syndrome (MetS) and hypercoagulability. The exact mechanisms that underlie the relation between those factors and CVD are not sufficiently known yet; pathogenic explanations are lacking also for the mechanisms relating metabolic factors to insulin resistance (IR) and the association with the development of atherosclerosis and thrombosis. The possible links between hypertension, hemostasis alterations and MetS are examined in this report.

## **Introduction**

There is increasing evidence for an association between atherothrombosis and the MetS, a cluster of risk factors for cardiovascular disease [1]. One of the most widely used definitions of the MetS is based on the presence of at least three of the 5 following conditions[2]: abdominal obesity (waist circumference: men, > 40 inches; women, >35 inches), hypertriglyceridaemia (>150 mg/dl), low levels of HDL (high density lipoprotein) cholesterol (c-HDL) (<40 mg/dl), arterial hypertension (>130/85 mm Hg), and hyperglycaemia (>100 mg/dl). Besides these conditions, the MetS is frequently accompanied by a prothrombotic state. This includes elevated plasma levels of PAI-1, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, von Willebrand factor, coagulation factors VIII, VII, XIII, and fibrinogen, tissue factor (TF), increased release of endothelial cell microparticles, and decreased protein C levels. Furthermore, patients with the MetS exhibit endothelial dysfunction (mainly decreased production of nitric oxide and prostacyclin) and heightened platelet reactivity [3]. Hypertension has been shown to be one of the most prominent features of the MetS present in up to 85% of patients. The establishment of hypertension as a component of the MetS has enabled better insight into the condition and allowed for its early detection and treatment. This review focuses specifically on the link between hypertension, hemostasis and MetS.

## **Hypertension and the metabolic syndrome**

Akintunde *et al.* [4] reported that MetS is present in at least one third of newly diagnosed, non-diabetic, hypertensive subjects. A higher prevalence of the MetS has been described in uncontrolled hypertensives as compared to subjects with blood pressure (BP) under control [5]. In contrast, strict control of BP reduces substantially the risk of coronary events in

patients with MetS [6]. In a study of Taiwanese Type 2 diabetic patients, hypertension was shown to be the most important component of MetS in association with ischemic heart disease compared to other risk factors, such as dyslipidaemia, obesity and microalbuminuria [7]. Furthermore, MetS is increasingly recognized as an important cardiovascular risk factor in hypertension, the presence of MetS seems to aggravate the severity of hypertension and to reduce the capacity of people to respond to specific treatments [8]. Hypertriglyceridaemia and low levels of high density lipoprotein (HDL) cholesterol are likely to be associated with this poor response to antihypertensive treatment in hypertensive patients with MetS [9].

Transgenic skinny mice and obese KKAy mice are both hyperleptinaemic and hypertensive due to chronic elevations in leptin resulting in enhanced sympathetic activity, which contributes to hypertension [10]. However, not all individuals with MetS have hypertension. Genetically obese leptin-deficient ob/ob mice ( $Lep^{ob/ob}$ ) are described as hypotensive [11]. However, results of Silvani *et al.* [12] suggest that, in the absence of leptin, obesity may entail hypertensive derangements of BP, which are substantially modulated by cardiovascular effects of the sleep-wake cycle. Moreover, leptin receptor-deficient db/db mice ( $LepR^{db/db}$ ) are reported to be both hypotensive and hypertensive as measured by telemetry in each of the two studies [13, 14].

Despite a close association between MetS components and high BP, understanding of individual contributions of some of the MetS components to the increment in BP is still complex. As one of the main causes of the MetS visceral obesity induces development of hypertension *via* production of various adipocytokines, such as leptin, TNF- $\alpha$ , IL-6 (Inter Leukin 6), angiotensinogen, and non-esterified fatty acids (NEFA) [15]. IR as another important pathophysiological feature of the MetS is related to an increased anti-natriuretic effect contributing to the development of hypertension in the MetS [16]. In IR individuals, high serum insulin levels are associated with increased levels of circulating endothelin-1 (ET-1) [17]. In another separate experiment, insulin infusion induced an increase in arterial ET-1 content, hypertension and subsequent plasma ET-1 elevation in rats [18]. Further studies showed that ET-1 receptor antagonism effectively reduced BP in animal models of IR and hypertension [19]. Furukawa *et al.* [20] reported that increased oxidative stress in accumulated fat is an early instigator of MetS. In MetS rats fed a high-fat and refined-carbohydrate diet, hypertension has been associated with endothelial dysfunction and oxidative stress by depressing Nitric Oxide Synthase (NOS) protein expression [21]. Moreover, a variety of studies have reported activation of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System

(RAAS) in obesity related hypertension [22]. Accumulating data indicate that Angiotensin II (AngII), which was known initially as a key factor involved in increasing central PP and aortic stiffness [23], inhibits the action of insulin via AngII type 1 (AT1) receptors in vascular muscle by interfering with insulin signaling through PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) and PKB (Protein Kinase B) signaling pathways [24]. AngII receptor blockers (ARBs) with the ability to selectively modulate activity of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), can increase adiponectin, decrease body weight and improve insulin sensitivity in patients with hypertension and the MetS [25, 26]. Furthermore, interesting evidence supports the existence of a local and specific adipocyte RAAS [27] which has the capacity to impact the systemic RAAS and thus disturb BP. Indeed, adipose tissue expresses all the constituents of the RAAS needed for the production of AngII, including angiotensinogen (AGT) [28] which contributes to approximately 30% of the systemic AGT levels in rodents, angiotensin-converting-enzyme (ACE) [29], a renin-like activity [30] and the AngII type 1 and 2 receptors (AT1R and AT2R) [31]. These components exert local effects by regulating adipose tissue growth and systemic effects by inducing production of high levels of circulating aldosterone which promotes development of impaired insulin metabolic signaling and endothelial function, which in turn contributes to hypertension (Figure 1) and associated cardiovascular and renal structural and functional abnormalities [32]. Thus, briefly, visceral obesity, IR, oxidative stress, endothelial dysfunction, activated RAAS and increased inflammatory mediators might be the main factors in the development of hypertension in the MetS.

### **Hemostasis and Metabolic syndrome**

It is well established that adipose tissue plays the role of an endocrine organ which releases factors known as adipokines. Studies have suggested that adipokines such as leptin, adiponectin, or ghrelin might contribute directly to the coexistence of IR and endothelial dysfunction [33] as described above. Adiponectin diminishes also platelet aggregation, epinephrine-, ADP- (Adenosine Di-Phosphate) or collagen-induced, and dose-dependently decreases soluble CD40L (Cluster of Differentiation 40 Ligand) release of a pro-inflammatory mediator of atherothrombosis [34, 35]. Serum leptin concentrations are correlated with the homeostatic index of IR which reflects the degree of IR [36]. Adiponectin, which is inversely correlated with abdominal fat, has very favorable cardiovascular effects [34, 37]. Tumour necrosis factor (TNF- $\alpha$ )-induced Nuclear factor  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) p65 subunit, a major regulator of TF expression in endothelial cells or monocytes [38, 39], is inhibited by

adiponectin, which enhances tissue factor pathway inhibitor (TFPI) expression and activity [40]. Ghrelin, the gut hormone, predominantly produced by the stomach is related to adipokine with respect to its food intake and energy metabolism functions. Ghrelin, through its anti-oxidative and anti-inflammatory effects, could protect against hepatotoxic agents such as carbon tetrachloride and restore activated partial thromboplastin time or fibrinogen plasma levels [41].

The prothrombotic state found in MetS is linked to hypercoagulability [42, 43]. The TF-VIIa complex catalyzes the conversion of factor X to Xa which, along with factor Va, leads to the conversion of prothrombin to thrombin. Amplification loops of the coagulation cascade comprise activation of essential cofactors V and VIII by thrombin. Increased plasma levels of any of those factors leads to a hypercoagulable state. Chronic inflammation induced by obesity is associated with increased TF [39] through the NF- $\kappa$ B pathway [44]. In the presence of MetS increased levels of factor VII and von Willebrand factor [45], which carries factor VIII [46] are found. Very low-density lipoproteins (VLDL) that are increased in MetS support activation of factor VII by the Xa/Va complex [47]. On the other hand HDL, which are decreased in MetS, enhance the protein C pathway, the principal inducible anticoagulant pathway [48].

Hypofibrinolysis, shown by increased clot lysis times [43], is one of the best-documented parts of MetS-induced abnormalities. The physiological role of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is to inhibit plasminogen activators such as tissue plasminogen-activator (t-PA) and to control the rate of fibrin degradation produced after thrombin generation. Plasma PAI-1 concentration is increased in subjects with MetS [49, 50]. Increased cardiovascular risk [51] and free fatty acids (FFAs) catalyze the induction of PAI-1 gene expression and PAI-1 protein expression [52]. Chronic inflammation, abdominal obesity, IR, all increase PAI-1 production [49, 53] and result in attenuated plasminogen conversion leading to a hypofibrinolytic state [54, 55].

The same factors that modifies endothelial function or clotting in MetS have been shown to impair also platelet function. Dyslipidaemia contributes to increased platelet activation [56], triglycerides increase platelet aggregability and the incidence of venous thromboembolism; these effects are reversed by HDL cholesterol [57]. Under physiological conditions, insulin decreases platelets responses to ADP and thrombin [58, 59]. Insulin resistant subjects have been linked to reduced platelet sensitivity to insulin related to loss of insulin-mediated suppression of ADP-induced P2y<sub>12</sub> signaling [60]. Elevated FFA concentrations and



hypertriglyceridaemia exert a proaggregating effect in vitro [61]. FFA levels are correlated with CD36 (Cluster of differentiation 36) mRNA expression [62] and the CD36 ligand facilitates the supply of FFAs for platelet thromboxane production which stimulates collagen-induced platelet aggregation [63].

Microparticles (MPs) must now be added to the MetS equation. MPs are fragments released from stimulated or apoptotic cells after plasma membrane remodeling. MPs are increased in MetS and could bind cells via specific receptors and induce cellular activation with the liberation of TF, cytokines [64] and increased endothelial dysfunction [65]. TF could be exposed at MP surfaces and is a major factor for MP thrombogenicity [66]. It has been reported that MPs are associated with CD36 which is found to be increased in obese and diabetic patients [67] and could participate in impaired platelet function. MP release is associated with inflammation and by transporting molecules such as TF or CD36 could participate in the increased coagulation and thrombogenicity found in MetS.

### **Animal models**

There are many, different, naturally occurring and gene-targeted mutations in rodents that lead to obesity and other metabolic defects associated with human MetS. Care should be taken when choosing an animal model for MetS studies, taking into account the diet used, as well as the degree to which they develop obesity, hyperlipidaemia, IR and hypertension. Although there is no perfect animal model of the human disease, each of the animal models described have specific attributes that make them useful for studying both the mechanisms of development and the link between hypertension, hemostasis and MetS.

#### Rat Models

Obese Zucker rats are the best known and most widely used animal model of genetic obesity. These animals present a mutation (*fa*) in the leptin receptor [68]. The *fa/fa* Zucker rats become noticeably obese between the third and the fifth week of the life. Obese Zucker rats present increased plasma glucose levels with an initial IR, followed by an insulin-deficient state associated with a body-weight plateau. This strain presents dyslipidemia and hyperinsulinaemia which is detectable at 3 weeks of age and persists throughout the animal's life. These disorders, which are all major specifications of the metabolic syndrome, should have contributed to arterial hypertension, as observed in humans. The increase in arterial BP in these animals may be explained, at least in part, by endothelial dysfunction observed in some studies on older obese Zucker rats [69]. However, it was shown that, during

development, sympathovagal modulation could play a major role in the lack of increase in arterial stiffness in obese Zucker rats, despite their IR, obesity, diabetes and dyslipidemia [70]. Indeed, alteration in sympathovagal balance could lead to a reduction in heart rate that in turn, could decrease arterial stiffness in obese Zucker rats.

Spontaneous hypertensive-stroke prone fatty rats were derived by replacing the *fa* locus of chromosome 5 of SHR-SP from Zucker fatty (*fa/fa*) rats [71]. SHR-SP fatty are unique in that they develop severe hypertension and present a good model of the IR syndrome [72]. SHR-SP fatty rats are characterised by the spontaneous development of fibrotic cardiac atria and ventricles, reduced heart rate and ventricular diastolic dysfunction, obesity, hyperleptinaemia and several metabolic disorders [73]. The SBP of these rats was significantly decreased compared with their lean controls, SHRSP/Izm rats. Then, the reduction of SBP in SHR-SP fatty rats may be related to the mutation of the leptin receptor gene. Plasma leptin levels are increased in this strain compared with their lean hypertensive controls [71]. Elsewhere it has been documented that leptin resistance induces hyperinsulinaemia and IR in humans and animals [74]. The SHR-SP fatty rats may develop IR because of failure to respond to leptin due to a mutation of the leptin receptor gene.

SHR-SP, are known for their severity of lesions and high rate of stroke onset. The main lesions in SHR-SP were fibrinoid necrosis and fibricellular proliferative lesions. These lesions were accompanied by endothelial injury and macrophage accumulation [75] suggesting that blood coagulation would be activated in SHR-SP because of the deteriorated endothelial anti-coagulant function and the expression of TF by activated endothelial cells and/or macrophages. However, hemorrhagic lesions rather than thrombotic lesions were easily found in the affected organs of SHR-SP. In addition, low levels of Thrombin-Antithrombin III complex (TAT) and fibrin/fibrinogen degeneration products (FDP) are found in SHR-SP compared with their normotensive, Wistar Kyoto rat controls, indicating that thrombin production was maintained at a low level in the plasma [76]. Thus, the SHR-SP rats fall into a hypocoagulable state which is quite different from the results of studies on haemostatic parameters in human hypertensives.

Obese spontaneously hypertensive rats, usually named Koletsky, have monogenetic obesity superimposed on a hypertensive genetic background [77]. This strain was derived by mating a spontaneously hypertensive (SHR) female rats of the Wistar Kyoto strain with normotensive Sprague-Dawley males [78]. This model presents obesity, hypertension, hyperinsulinaemia, hyperlipidaemia and nephropathy superimposed on the background of SHR [78, 79]

Spontaneously hypertensive and hyperlipidaemic rats (SHHR) are a combination of the hypertension and hyperlipidaemia model which is the result of mating of SHR and spontaneously hyperlipidaemic rats (HLR) [80]. SHHR rats exhibit hypertension which may be related to elevated sympathetic nervous system tone that has been proposed as the cause of hypertension in SHR [81]. Otherwise, lesions in the endothelium and lipid deposition under the endothelium are observed in the aorta of 24 month old female SHHR, despite a normal diet. In parallel, increases in plasma levels of fibrinogen, TAT and  $\alpha$ 2-Pi ( $\alpha$ 2-Plasmin Inhibitor) are observed in this strain [42] and suggest an hypercoagulative state.

### Mouse models

Leptin-deficient mice ( $Lep^{ob/ob}$ ) which cannot produce leptin due to an inactivating mutation in the leptin gene, arose from a spontaneous mutation at the Jackson Laboratory [82]. The genetic background is an extremely important consideration for the use of  $Lep^{ob/ob}$  mice in studying the MetS. These mice are visually obese by 4 weeks of age, and their growth curves do not plateau even at 12 months of age. Leptin deficiency results in hyperphagia, reduced energy expenditure and extreme obesity. In addition, this strain presents mild hyperglycaemia that is apparent transiently from 8 to 12 weeks of age. At this point, pancreatic  $\beta$ -cell compensation occurs and increased insulin levels bring glucose homeostasis under control [83]. In addition, these mice express increased HDL levels with a catabolic pathway which is down-regulated in this strain and suggest that HDL apolipoprotein turnover may be regulated by obesity and leptin signalling [84, 85]. In salt-sensitive hypertension, these obese mice express renal injury due to their obesity that induces renal oxidative stress [86]. Studies on BP in  $Lep^{ob/ob}$  mice have yielded contrasting results, evidence of hypotension [87], no significant differences in BP [88] or hypertension limited to the light period [89] compared with their lean controls. However, because of their obesity,  $Lep^{ob/ob}$  mice have shown hypertensive derangements of BP that appear to be modulated by cardiovascular effects of the sleep-wake cycle [12]. Otherwise, studies on vascular injury have shown that leptin-deficient and leptin receptor-deficient mice thrombose less than their controls. Leptin administration increased occlusion in these two mutant mice [90]

Leptin receptor-deficient mice ( $LepR^{db/db}$ ) do not have leptin receptors. As with  $Lep^{ob/ob}$  mice, the obese and insulin-resistant phenotype of  $LepR^{db/db}$  mice depends upon their genetic background. The metabolic profiles of  $LepR^{db/db}$  and  $Lep^{ob/ob}$  mice are nearly identical. Both models are obese, hyperinsulinaemic, hyperglycaemic (depending on the age and strain), have

elevated total cholesterol levels [83] and less thrombosis following onset of vascular injury. The primary difference between the two models is that the LepR<sup>db/db</sup> mice have dramatic elevations in circulating leptin concentrations that are proportional to their degree of adiposity, whereas the Lep<sup>ob/ob</sup> mice do not have circulating leptin [90, 91]. Bodary . *et al.* [13] have reported reduced arterial pressure in LepR<sup>db/db</sup> compared with wild-type mice with leptin. However, studies have demonstrated that *db/db* mice are hypertensive with a disrupted BP, heart rate, and locomotor activity circadian rhythms [14].

Ldlr<sup>-/-</sup> Lep<sup>ob/ob</sup> / Apob48<sup>-/-</sup>Lep<sup>ob/ob</sup> mice were derived by crossing of Lep<sup>ob/ob</sup> with Ldlr<sup>-/-</sup> and Lep<sup>ob/ob</sup> with Apob48<sup>-/-</sup> respectively [92]. These two mice models present phenotypes of the MetS combining obesity, hyperglycaemia, hyperinsulinaemia, hyperlipidaemia, and hypertension. The two lines have different lipid profiles and thus can be used for different purposes. Interestingly, Apob48<sup>-/-</sup>Lep<sup>ob/ob</sup> mice are diabetic by 9-10 weeks whereas Ldlr<sup>-/-</sup>Lep<sup>ob/ob</sup> mice are not. This may be because of their respective genotypes.

The New Zealand obese (NZO) mouse model exhibits a polygenic obesity associated with hyperinsulinaemia and hyperglycaemia. It has been shown that this strain presents additional features of the MetS, elevated BP, serum cholesterol and serum triglyceride levels [93]. In addition, studies have shown that these mice exhibit endothelial dysfunction attributed to eNOS uncoupling and increased reactive oxygen species (ROS) production [94]. Indeed, this strain presents traits of the human MetS and is therefore an ideal model for the study of the pathophysiology of a MetS, and for the identification of the responsible genes.

### **Links between hypertension and hypercoagulability in the metabolic syndrome**

Hypertension is one of the factors which cause the most damage in the vascular wall and its main complications (stroke and myocardial infarction) are paradoxically thrombotic rather than haemorrhagic. Early in 1995, Miller *et al.* [95] had already demonstrated that hypertensive patients exhibited a relatively hypercoagulative state because of enhanced TF expression. TF plays a significant role in both thrombus formation and in the progression of atherosclerosis in patients with MetS [96]. Recent studies have shown that up-regulation of monocyte TF activity is significantly associated with carotid intima-media thickness in MetS patients, characterized by higher BP and procoagulant activity compared with control subjects [38]. The vascular wall as a natural anticoagulant blood container requires the maintenance of a certain level of various procoagulant or anticoagulant components. The balance between TF

and TFPI acts as an important regulator of blood coagulation activity. Regnault *et al.* [97] reported that in postmenopausal women, in which an increase in arterial stiffness is associated with both changes in vascular wall status and the presence of a hypercoagulative state, free TFPI increased as the vascular wall function deteriorated and pulse pressure (PP) increased. Furthermore, their findings are supported by an increase of TFPI synthesized by VSMCs (Vascular Smooth Muscle Cells) in response to cyclic stress *in vitro*.

A number of studies have shown that rheological, haemostatic, endothelial and platelet abnormalities play a key role in the thrombotic complications of hypertension. Ajayi *et al.* [98] reported that fatty Zucker diabetic rats exhibited a more severe hypertension than their lean controls; moreover, as compared with the female rats, the male group presented a greater prothrombotic activity and a worse impairment of endothelial reactivity. In spontaneously hypertensive and hyperlipidaemic rats (SHHR), hypertension and its related-hyperlipidaemia caused vascular damage that lead to a hypercoagulative state, due to increased plasma levels of fibrinogen [42, 99]. The hypercoagulative state in hypertension may further contribute to the increased risk and severity of target organ damage [100]. Anand *et al.* [101] showed that individuals with the MetS suffer an excess of CVD explained by an excess of atherosclerosis and impaired fibrinolysis. Nevertheless, the relation between hypertension and hypercoagulability is still controversial. For example, Abumiya *et al.* [76] reported that the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR-SP) gets into a hypocoagulable state rather than a hypercoagulative state, and that the reduction of factor Xa activity in SHR-SP may be related to the elevation of C1 inhibitor activity. Thus, the links between increased artery pressure and hypercoagulability still remain to be investigated.

The precise mechanisms that drive the hypercoagulable state associated with hypertension may be still uncertain, but the RAAS seems to be a good possibility. A significant relation between plasma renin activity (PRA) and plasma aldosterone with markers of activated coagulation and decreased fibrinolytic activity was demonstrated in patients with essential hypertension [100]. AngII accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats *via* its AT1 receptor, probably due to fibrinolysis inhibition [102]. The formation of the t-PA and PAI-1 complex reduces fibrinolytic activity through inhibition of plasminogen activation. Moreover, the levels of PAI-1 and t-PA were positively related to systolic and diastolic blood pressures (SBP and DBP) in a large cohort (>2500 person) of essentially healthy middle-aged men and woman [50]. Since both of t-PA and PAI-1 are synthesized in the vascular endothelium, endothelium dysfunction induces an imbalance in fibrinolysis [103].

Hypertensive patients with MetS have higher levels of free PAI-1 and t-PA antigen, which will increase the risk of CVD [100]. AngII has been shown to oppose the effect of NO, stimulate the production of adhesion factors, PAI-1 and decrease the level of t-PA, promoting thus the risk of thrombosis. Moreover, AngII and aldosterone interact synergistically to increase PAI-1 production in humans, and only dual AT1 and aldosterone receptor antagonism can prevent the effect of activation of the RAAS on circulating PAI-1 antigen [104]. In therapy-resistant hypertensive patients, the AT1 receptor blocker (AT1RB) eprosartan, inhibited fibrinolytic function as reflected by decreased PAI-1 antigen, PAI-1 activity and t-PA antigen [105]. Additionally, agonistic AT1 receptor auto-antibodies (AT1-AA) and AngII can cause monocytes to produce TF, and both of them induced significantly higher expression of TF in monocytes from hypertensive patients compared to control subjects [106].

## **Conclusion**

Hypertension and hypercoagulability are strongly correlated in most cases of MetS probably due to an activated RAAS system coupled with a vascular damage, endothelial dysfunction, an excess of procoagulant factors and relative fibrinolysis inhibition (Figure 2).

We have described the case in human with the problem of interconnectability between the cardiovascular events and obesity diabetes as well as the thrombotic condition. But it is difficult to find an ideal animal model (as we have shown) that covers all the conditions.

It would appear then that research will continue for some time using these animal models to investigate aspects of the global problem. Future treatments will have to take into account this complexity trying to unravel in humans why so many symptoms are associated with obesity diabetes and cardiovascular pathology. Not to forget to mention that the current association of these systems with the state of coagulation is also a risk factor in cardiovascular disease.

## Acknowledgements

We thank Prof. Simon N Thornton, INSERM U961, for editing and correcting English.

## References

- [1] I. Palomo, R. Moore-Carrasco, M. Alarcon, A. Rojas, F. Espana, V. Andres and H. Gonzalez-Navarro, Pathophysiology of the proatherothrombotic state in the metabolic syndrome, *Front Biosci (Schol Ed)*, 2 (2010), 194-208.
- [2] NCEP, Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report, *Circulation*, 106 (2002), 3143-421.
- [3] M. Franchini, G. Targher, M. Montagnana and G. Lippi, The metabolic syndrome and the risk of arterial and venous thrombosis, *Thromb Res*, 122 (2008), 727-35.
- [4] A. A. Akintunde, O. E. Ayodele, P. O. Akinwusi and G. O. Opadijo, Metabolic syndrome: comparison of occurrence using three definitions in hypertensive patients, *Clin Med Res*, 9 (2010), 26-31.
- [5] E. Bog-Hansen, U. Lindblad, B. Gullberg, A. Melander and L. Rastam, Metabolic disorders associated with uncontrolled hypertension, *Diabetes Obes Metab*, 5 (2003), 379-87.
- [6] N. D. Wong, J. R. Pio, S. S. Franklin, G. J. L'Italien, T. V. Kamath and G. R. Williams, Preventing coronary events by optimal control of blood pressure and lipids in patients with the metabolic syndrome, *Am J Cardiol*, 91 (2003), 1421-6.
- [7] C. H. Tseng, C. K. Chong, C. P. Tseng, W. Y. Shau and T. Y. Tai, Hypertension is the most important component of metabolic syndrome in the association with ischemic heart disease in Taiwanese type 2 diabetic patients, *Circ J*, 72 (2008), 1419-24.
- [8] R. Rossi, A. Nuzzo, G. Origliani and M. G. Modena, Metabolic syndrome affects cardiovascular risk profile and response to treatment in hypertensive postmenopausal women, *Hypertension*, 52 (2008), 865-72.
- [9] W. Zidek, L. Naditch-Brule, S. Perlini, C. Farsang and S. E. Kjeldsen, Blood pressure control and components of the metabolic syndrome: the GOOD survey, *Cardiovasc Diabetol*, 8 (2009), 51.
- [10] M. Aizawa-Abe, Y. Ogawa, H. Masuzaki, K. Ebihara, N. Satoh, H. Iwai, N. Matsuoka, T. Hayashi, K. Hosoda, G. Inoue, Y. Yoshimasa and K. Nakao, Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension, *J Clin Invest*, 105 (2000), 1243-52.

- [11] A. L. Mark, R. A. Shaffer, M. L. Correia, D. A. Morgan, C. D. Sigmund and W. G. Haynes, Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice, *J Hypertens*, 17 (1999), 1949-53.
- [12] A. Silvani, S. Bastianini, C. Berteotti, C. Franzini, P. Lenzi, V. Lo Martire and G. Zoccoli, Sleep modulates hypertension in leptin-deficient obese mice, *Hypertension*, 53 (2009), 251-5.
- [13] P. F. Bodary, Y. Shen, M. Ohman, K. L. Bahrou, F. B. Vargas, S. S. Cudney, K. J. Wickenheiser, M. G. Myers, Jr. and D. T. Eitzman, Leptin regulates neointima formation after arterial injury through mechanisms independent of blood pressure and the leptin receptor/STAT3 signaling pathways involved in energy balance, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (2007), 70-6.
- [14] W. Su, Z. Guo, D. C. Randall, L. Cassis, D. R. Brown and M. C. Gong, Hypertension and disrupted blood pressure circadian rhythm in type 2 diabetic db/db mice, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295 (2008), H1634-41.
- [15] H. Katagiri, T. Yamada and Y. Oka, Adiposity and cardiovascular disorders: disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals, *Circ Res*, 101 (2007), 27-39.
- [16] L. A. Sechi, Mechanisms of insulin resistance in rat models of hypertension and their relationships with salt sensitivity, *J Hypertens*, 17 (1999), 1229-37.
- [17] P. A. Sarafidis and G. L. Bakris, Review: Insulin and endothelin: an interplay contributing to hypertension development?, *J Clin Endocrinol Metab*, 92 (2007), 379-85.
- [18] C. C. Juan, Y. W. Shen, Y. Chien, Y. J. Lin, S. F. Chang and L. T. Ho, Insulin infusion induces endothelin-1-dependent hypertension in rats, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287 (2004), E948-54.
- [19] S. DeLoach, Y. Huan, C. Daskalakis and B. Falkner, Endothelin-1 response to glucose and insulin among African Americans, *J Am Soc Hypertens*, 4 (2010), 227-35.
- [20] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda and I. Shimomura, Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *J Clin Invest*, 114 (2004), 1752-61.
- [21] C. K. Roberts, R. J. Barnard, R. K. Sindhu, M. Jurczak, A. Ehdai and N. D. Vaziri, A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression, *J Appl Physiol*, 98 (2005), 203-10.
- [22] J. E. Hall, Pathophysiology of obesity hypertension, *Curr Hypertens Rep*, 2 (2000), 139-47.



- [23] P. Lacolley, M. E. Safar, V. Regnault and E. D. Frohlich, Angiotensin II, mechanotransduction, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297 (2009), H1567-75.
- [24] J. R. Sowers, Insulin resistance and hypertension, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286 (2004), H1597-602.
- [25] M. Pravenec and T. W. Kurtz, Molecular genetics of experimental hypertension and the metabolic syndrome: from gene pathways to new therapies, *Hypertension*, 49 (2007), 941-52.
- [26] S. Makita, A. Abiko, Y. Naganuma, Y. Moriai and M. Nakamura, Effects of telmisartan on adiponectin levels and body weight in hypertensive patients with glucose intolerance, *Metabolism*, 57 (2008), 1473-8.
- [27] S. Engeli, R. Negrel and A. M. Sharma, Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system, *Hypertension*, 35 (2000), 1270-7.
- [28] L. A. Cassis, J. Saye and M. J. Peach, Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA, *Hypertension*, 11 (1988), 591-6.
- [29] P. Schling, H. Mallow, A. Trindl and G. Loffler, Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes, *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23 (1999), 336-41.
- [30] U. Shenoy and L. Cassis, Characterization of renin activity in brown adipose tissue, *Am J Physiol*, 272 (1997), C989-99.
- [31] L. A. Cassis, M. J. Fetting, A. L. Roe, U. R. Shenoy and G. Howard, Characterization and regulation of angiotensin II receptors in rat adipose tissue. Angiotensin receptors in adipose tissue, *Adv Exp Med Biol*, 396 (1996), 39-47.
- [32] A. Whaley-Connell, M. S. Johnson and J. R. Sowers, Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and resistant hypertension, *Prog Cardiovasc Dis*, 52 (2010), 401-9.
- [33] A. E. Schutte, H. W. Huisman, R. Schutte, J. M. van Rooyen, L. Malan, C. M. Fourie and N. T. Malan, Adipokines and cardiometabolic function: How are they interlinked?, *Regul Pept*, 164 (2010), 133-8.
- [34] H. Kato, H. Kashiwagi, M. Shiraga, S. Tadokoro, T. Kamae, H. Ujiie, S. Honda, S. Miyata, Y. Ijiri, J. Yamamoto, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Kurata, I. Shimomura, Y. Tomiyama and Y. Kanakura, Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (2006), 224-30.

- [35] P. Restituto, I. Colina, J. J. Varo and N. Varo, Adiponectin diminishes platelet aggregation and sCD40L release. Potential role in the metabolic syndrome, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298 (2011), E1072-7.
- [36] R. Lichnovska, S. Gwozdziejwiczova, R. Chlup and J. Hrebicek, Serum leptin in the development of insulin resistance and other disorders in the metabolic syndrome, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 149 (2005), 119-26.
- [37] S. Stork, M. L. Bots, P. Angerer, C. von Schacky, D. E. Grobbee, C. E. Angermann and J. Seufert, Low levels of adiponectin predict worsening of arterial morphology and function, *Atherosclerosis*, 194 (2007), e147-53.
- [38] A. Nakagomi, M. Sasaki, Y. Ishikawa, T. Shibui, M. Kosugi, Y. Endoh, M. Morikawa, Y. Kusama, H. Atarashi and K. Mizuno, Upregulation of monocyte tissue factor activity is significantly associated with carotid intima-media thickness in patients with metabolic syndrome, *J Atheroscler Thromb*, 18 (2011), 475-86.
- [39] F. Samad, M. Pandey and D. J. Loskutoff, Regulation of tissue factor gene expression in obesity, *Blood*, 98 (2001), 3353-8.
- [40] Y. J. Chen, L. Q. Zhang, G. P. Wang, H. Zeng, B. Lu, X. L. Shen, Z. P. Jiang and F. P. Chen, Adiponectin inhibits tissue factor expression and enhances tissue factor pathway inhibitor expression in human endothelial cells, *Thromb Haemost*, 100 (2008), 291-300.
- [41] O. F. Arici and N. Cetin, Protective role of ghrelin against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced coagulation disturbances in rats, *Regul Pept*, 166 (2011), 139-42.
- [42] H. Amagasa, M. Okazaki, S. Iwai, T. Kumai, S. Kobayashi and K. Oguchi, Enhancement of the coagulation system in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats, *J Atheroscler Thromb*, 12 (2005), 191-8.
- [43] A. M. Carter, C. M. Cymbalista, T. D. Spector and P. J. Grant, Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (2007), 2783-9.
- [44] G. E. Sonnenberg, G. R. Krakower and A. H. Kissebah, A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome, *Obes Res*, 12 (2004), 180-6.
- [45] H. S. Lim, G. Y. Lip and A. D. Blann, Plasma von Willebrand factor and the development of the metabolic syndrome in patients with hypertension, *J Clin Endocrinol Metab*, 89 (2004), 5377-81.
- [46] A. J. Lansbury, P. J. Grant and A. J. Catto, Atherothrombotic risk factors in subjects with a family history of stroke, *Cerebrovasc Dis*, 14 (2002), 153-60.

- [47] P. J. Grant, Diabetes mellitus as a prothrombotic condition, *J Intern Med*, 262 (2007), 157-72.
- [48] C. Mineo, H. Deguchi, J. H. Griffin and P. W. Shaul, Endothelial and antithrombotic actions of HDL, *Circ Res*, 98 (2006), 1352-64.
- [49] A. Pandolfi, D. Cetrullo, R. Polishuck, M. M. Alberta, A. Calafiore, G. Pellegrini, E. Vitacolonna, F. Capani and A. Consoli, Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21 (2001), 1378-82.
- [50] K. A. Poli, G. H. Tofler, M. G. Larson, J. C. Evans, P. A. Sutherland, I. Lipinska, M. A. Mittleman, J. E. Muller, R. B. D'Agostino, P. W. Wilson and D. Levy, Association of blood pressure with fibrinolytic potential in the Framingham offspring population, *Circulation*, 101 (2000), 264-9.
- [51] T. Hoekstra, J. M. Geleijnse, E. G. Schouten and C. Kluft, Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk, *Thromb Haemost*, 91 (2004), 861-72.
- [52] C. Banfi, L. Mussoni, P. Rise, M. G. Cattaneo, L. Vicentini, F. Battaini, C. Galli and E. Tremoli, Very low density lipoprotein-mediated signal transduction and plasminogen activator inhibitor type 1 in cultured HepG2 cells, *Circ Res*, 85 (1999), 208-17.
- [53] F. Samad, M. Pandey, P. A. Bell and D. J. Loskutoff, Insulin continues to induce plasminogen activator inhibitor 1 gene expression in insulin-resistant mice and adipocytes, *Mol Med*, 6 (2000), 680-92.
- [54] M. C. Alessi and I. Juhan-Vague, PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (2006), 2200-7.
- [55] A. Suehiro, I. Wakabayashi, K. Uchida, T. Yamashita and J. Yamamoto, Impaired spontaneous thrombolytic activity measured by global thrombosis test in males with metabolic syndrome, *Thromb Res*, (2011),
- [56] M. Kjalke, A. Silveira, A. Hamsten, U. Hedner and M. Ezban, Plasma lipoproteins enhance tissue factor-independent factor VII activation, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20 (2000), 1835-41.
- [57] C. J. Doggen, R. N. Lemaitre, N. L. Smith, S. R. Heckbert and B. M. Psaty, HMG CoA reductase inhibitors and the risk of venous thrombosis among postmenopausal women, *J Thromb Haemost*, 2 (2004), 700-1.
- [58] A. D. Baron, Vascular reactivity, *Am J Cardiol*, 84 (1999), 25J-27J.

- [59] H. O. Steinberg, G. Brechtel, A. Johnson, N. Fineberg and A. D. Baron, Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release, *J Clin Invest*, 94 (1994), 1172-9.
- [60] I. A. Ferreira, A. I. Mocking, M. A. Feijge, G. Gorter, T. W. van Haeften, J. W. Heemskerk and J. W. Akkerman, Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (2006), 417-22.
- [61] N. A. Englyst, J. M. Taube, T. J. Aitman, T. P. Baglin and C. D. Byrne, A novel role for CD36 in VLDL-enhanced platelet activation, *Diabetes*, 52 (2003), 1248-55.
- [62] K. Gertow, K. H. Pietilainen, H. Yki-Jarvinen, J. Kaprio, A. Rissanen, P. Eriksson, A. Hamsten and R. M. Fisher, Expression of fatty-acid-handling proteins in human adipose tissue in relation to obesity and insulin resistance, *Diabetologia*, 47 (2004), 1118-25.
- [63] G. E. Jarvis, B. T. Atkinson, D. C. Snell and S. P. Watson, Distinct roles of GPVI and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens, *Br J Pharmacol*, 137 (2002), 107-17.
- [64] M. Mesri and D. C. Altieri, Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway, *J Biol Chem*, 274 (1999), 23111-8.
- [65] A. Agouni, A. H. Lagrue-Lak-Hal, P. H. Ducluzeau, H. A. Mostefai, C. Draunet-Busson, G. Leftheriotis, C. Heymes, M. C. Martinez and R. Andriantsitohaina, Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome, *Am J Pathol*, 173 (2008), 1210-9.
- [66] O. Morel, F. Toti, B. Hugel, B. Bakouboula, L. Camoin-Jau, F. Dignat-George and J. M. Freyssinet, Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (2006), 2594-604.
- [67] M. J. Alkhatatbeh, N. M. Mhaidat, A. K. Enjeti, L. F. Lincz and R. F. Thorne, The putative diabetic plasma marker, soluble CD36, is non-cleaved, non-soluble and entirely associated with microparticles, *J Thromb Haemost*, 9 (2011), 844-51.
- [68] M. S. Phillips, Q. Liu, H. A. Hammond, V. Dugan, P. J. Hey, C. J. Caskey and J. F. Hess, Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat, *Nat Genet*, 13 (1996), 18-9.
- [69] R. Subramanian and K. M. MacLeod, Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats, *Eur J Pharmacol*, 477 (2003), 143-52.
- [70] E. Cosson, P. Valensi, D. Laude, D. Mesangeau and H. Dabire, Arterial stiffness and the autonomic nervous system during the development of Zucker diabetic fatty rats, *Diabetes Metab*, 35 (2009), 364-70.

- [71] J. Hiraoka-Yamamoto, Y. Nara, N. Yasui, Y. Onobayashi, S. Tsuchikura and K. Ikeda, Establishment of a new animal model of metabolic syndrome: SHRSP fatty (fa/fa) rats, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 31 (2004), 107-9.
- [72] M. Collison, A. M. Glazier, D. Graham, J. J. Morton, M. H. Dominiczak, T. J. Aitman, J. M. Connell, G. W. Gould and A. F. Dominiczak, Cd36 and molecular mechanisms of insulin resistance in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat, *Diabetes*, 49 (2000), 2222-6.
- [73] Y. Tada, S. Kagota, M. Matsumoto, Y. Naito, H. Shibata, N. Nejime, T. Tsujino, M. Koshihara, T. Masuyama and K. Shinozuka, Characterization of cardiac size and function in SHRSP.Z-Lepr(fa)/IzmDmcr rats, a new animal model of metabolic syndrome, *Biol Pharm Bull*, 33 (2010), 1971-6.
- [74] Y. Anini and P. L. Brubaker, Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion, *Diabetes*, 52 (2003), 252-9.
- [75] T. Abumiya, J. Masuda, J. Kawai, T. Suzuki and J. Ogata, Heterogeneity in the appearance and distribution of macrophage subsets and their possible involvement in hypertensive vascular lesions in rats, *Lab Invest*, 75 (1996), 125-36.
- [76] T. Abumiya, T. Sakata, K. Enjyoji, H. Kato, J. Kawai, T. Suzuki, J. Masuda, T. Sasaguri and J. Ogata, Does hypertension confer a hypercoagulable state in stroke-prone spontaneously hypertensive rats?, *J Hypertens*, 18 (2000), 901-9.
- [77] T. Ishizuka, P. Ernsberger, S. Liu, D. Bedol, T. M. Lehman, R. J. Koletsky and J. E. Friedman, Phenotypic consequences of a nonsense mutation in the leptin receptor gene (fak) in obese spontaneously hypertensive Koletsky rats (SHROB), *J Nutr*, 128 (1998), 2299-306.
- [78] S. Koletsky, Pathologic findings and laboratory data in a new strain of obese hypertensive rats, *Am J Pathol*, 80 (1975), 129-42.
- [79] P. Ernsberger, R. J. Koletsky, D. D. Kline, D. M. Bedol and J. E. Friedman, The SHROB model of syndrome X: effects of excess dietary sucrose, *Ann N Y Acad Sci*, 892 (1999), 315-8.
- [80] T. Kumai, S. Oonuma, Y. Kitaoka, M. Tadokoro and S. Kobayashi, Biochemical and morphological characterization of spontaneously hypertensive hyperlipidaemic rats, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30 (2003), 537-44.
- [81] K. Okamoto, S. Nosaka, Y. Yamori and M. Matsumoto, Participation of neural factor in the pathogenesis of hypertension in the spontaneously hypertensive rat, *Jpn Heart J*, 8 (1967), 168-80.
- [82] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature*, 372 (1994), 425-32.

- [83] A. J. Kennedy, K. L. Ellacott, V. L. King and A. H. Hasty, Mouse models of the metabolic syndrome, *Dis Model Mech*, 3 (2010), 156-66.
- [84] H. Hyogo, S. Roy and D. E. Cohen, Restoration of gallstone susceptibility by leptin in C57BL/6J ob/ob mice, *J Lipid Res*, 44 (2003), 1232-40.
- [85] D. L. Silver, X. C. Jiang and A. R. Tall, Increased high density lipoprotein (HDL), defective hepatic catabolism of ApoA-I and ApoA-II, and decreased ApoA-I mRNA in ob/ob mice. Possible role of leptin in stimulation of HDL turnover, *J Biol Chem*, 274 (1999), 4140-6.
- [86] J. E. Quigley, A. A. Elmarakby, S. F. Knight, M. M. Manhiani, D. W. Stepp, J. J. Olearczyk and J. D. Imig, Obesity induced renal oxidative stress contributes to renal injury in salt-sensitive hypertension, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 36 (2009), 724-8.
- [87] C. Christoffersen, E. Bollano, M. L. Lindegaard, E. D. Bartels, J. P. Goetze, C. B. Andersen and L. B. Nielsen, Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice, *Endocrinology*, 144 (2003), 3483-90.
- [88] F. Dong, X. Zhang, X. Yang, L. B. Esberg, H. Yang, Z. Zhang, B. Culver and J. Ren, Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice, *J Endocrinol*, 188 (2006), 25-36.
- [89] S. J. Swoap, Altered leptin signaling is sufficient, but not required, for hypotension associated with caloric restriction, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281 (2001), H2473-9.
- [90] P. F. Bodary, R. J. Westrick, K. J. Wickenheiser, Y. Shen and D. T. Eitzman, Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice, *JAMA*, 287 (2002), 1706-9.
- [91] P. F. Bodary, S. Gu, Y. Shen, A. H. Hasty, J. M. Buckler and D. T. Eitzman, Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005), e119-22.
- [92] D. J. Lloyd, J. McCormick, J. Helmering, K. W. Kim, M. Wang, P. Fordstrom, S. A. Kaufman, R. A. Lindberg and M. M. Veniant, Generation and characterization of two novel mouse models exhibiting the phenotypes of the metabolic syndrome: Apob48<sup>-/-</sup>Lepob/ob mice devoid of ApoE or Ldlr, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294 (2008), E496-505.
- [93] J. R. Ortlepp, R. Kluge, K. Giesen, L. Plum, P. Radke, P. Hanrath and H. G. Joost, A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse, *Eur J Clin Invest*, 30 (2000), 195-202.
- [94] C. Marchesi, T. Ebrahimian, O. Angulo, P. Paradis and E. L. Schiffrin, Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation

contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome, *Hypertension*, 54 (2009), 1384-92.

[95] M. A. Miller, C. R. Spillert, R. Ponnudurai, S. Bonthu and E. J. Lazaro, Are hypertensives hypercoagulable?, *J Natl Med Assoc*, 87 (1995), 71-2.

[96] M. Diamant, R. Nieuwland, R. F. Pablo, A. Sturk, J. W. Smit and J. K. Radder, Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus, *Circulation*, 106 (2002), 2442-7.

[97] V. Regnault, C. Perret-Guillaume, A. Kearney-Schwartz, J. P. Max, C. Labat, H. Louis, D. Wahl, B. Pannier, T. Lecompte, G. Weryha, P. Challande, M. E. Safar, A. Benetos and P. Lacolley, Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31 (2011), 1226-32.

[98] A. A. Ajayi, H. Hercule, J. Cory, B. E. Hayes and A. O. Oyekan, Gender difference in vascular and platelet reactivity to thromboxane A<sub>2</sub>-mimetic U46619 and to endothelial dependent vasodilation in Zucker fatty (hypertensive, hyperinsulinemic) diabetic rats, *Diabetes Res Clin Pract*, 59 (2003), 11-24.

[99] H. Gomibuchi, M. Okazaki, S. Iwai, T. Kumai, S. Kobayashi and K. Oguchi, Development of hyperfibrinogenemia in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats: a potentially useful animal model as a complication of hypertension and hyperlipidemia, *Exp Anim*, 56 (2007), 1-10.

[100] L. A. Sechi, M. Novello, G. Colussi, A. Di Fabio, A. Chiuch, E. Nadalini, A. Casanova-Borca, A. Uzzau and C. Catena, Relationship of plasma renin with a prothrombotic state in hypertension: relevance for organ damage, *Am J Hypertens*, 21 (2008), 1347-53.

[101] S. S. Anand, Q. Yi, H. Gerstein, E. Lonn, R. Jacobs, V. Vuksan, K. Teo, B. Davis, P. Montague and S. Yusuf, Relationship of metabolic syndrome and fibrinolytic dysfunction to cardiovascular disease, *Circulation*, 108 (2003), 420-5.

[102] M. Kaminska, A. Mogielnicki, A. Stankiewicz, K. Kramkowski, T. Domaniewski, W. Buczko and E. Chabielska, Angiotensin II via AT<sub>1</sub> receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats, *J Physiol Pharmacol*, 56 (2005), 571-85.

[103] C. S. Coffey, F. W. Asselbergs, P. R. Hebert, H. L. Hillege, Q. Li, J. H. Moore and W. H. van Gilst, The Association of the Metabolic Syndrome with PAI-1 and t-PA Levels, *Cardiol Res Pract*, 2011 (2011), 541467.

- [104] P. Sawathiparnich, L. J. Murphey, S. Kumar, D. E. Vaughan and N. J. Brown, Effect of combined AT1 receptor and aldosterone receptor antagonism on plasminogen activator inhibitor-1, *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (2003), 3867-73.
- [105] A. W. Dielis, M. Smid, H. M. Spronk, A. J. Houben, K. Hamulyak, A. A. Kroon, H. Ten Cate and P. W. de Leeuw, Changes in fibrinolytic activity after angiotensin II receptor blockade in therapy-resistant hypertensive patients, *J Thromb Haemost*, 5 (2007), 1509-15.
- [106] Y. Dorffel, G. Wallukat, N. Bochnig, V. Homuth, M. Herberg, W. Dorffel, A. Pruss, R. Chaoui and J. Scholze, Agonistic AT(1) receptor autoantibodies and monocyte stimulation in hypertensive patients, *Am J Hypertens*, 16 (2003), 827-33.
- [107] T. W. Kurtz, R. C. Morris and H. A. Pershadsingh, The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension, *Hypertension*, 13 (1989), 896-901.
- [108] W. Paul, L. R. Queen, C. P. Page and A. Ferro, Increased platelet aggregation in vivo in the Zucker Diabetic Fatty rat: differences from the streptozotocin diabetic rat, *Br J Pharmacol*, 150 (2007), 105-11.
- [109] A. K. Sista, M. K. O'Connell, T. Hinohara, S. S. Oommen, B. E. Fenster, A. J. Glassford, E. A. Schwartz, C. A. Taylor, G. M. Reaven and P. S. Tsao, Increased aortic stiffness in the insulin-resistant Zucker fa/fa rat, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289 (2005), H845-51.
- [110] S. Koletsky, Animal model: obese hypertensive rat, *Am J Pathol*, 81 (1975), 463-6.



## Figures Legends

**Figure 1:** Proposed Relation between Metabolic Syndrome and obesity-related-hypertension.

Ang: Angiotensin; ACE: Angiotensin converting enzyme; ATR: Angiotensin receptor; AGT: angiotensinogen; TNF- $\alpha$ : Tumor necrotic factor-alpha

**Figure 2:** Involvement of hypertension, hypercoagulability and metabolic syndrome in cardiovascular disease.

CVD: cardiovascular disease; RAAS: Renin angiotensin aldosterone system;

Table 1: Main abnormalities that characterise the different rat and mouse strains that could be used as an animal model of MetS and its interactions with hypertension and/or coagulation

Model	Description	Hyperlipidemia	IR	Hypertension	Hypercoagulability	Model for studying	References
<b>Rat</b>							
Obese Zucker	Leptin receptor-/-	Yes	Yes	Yes	Prothrombotic state	MetS and interactions with hypertension	[69, 70, 107-109]
SHR-SP	Spontaneous hypertension	No	Yes	Yes	Hemorrhagic lesions, hypocoagulative state	Hypertension and interaction with coagulation	[72, 75, 76]
SHR-SP fatty	Spontaneous Hypertension Leptin receptor-/-	Yes	Yes	Yes	ND	Obesity, hyperlipidemia and interaction with hypertension	[71-73]
Obese SHR	Spontaneous Hypertension	Yes	Yes	Yes	ND	Hypertension and interaction with MetS	[79, 110]
SHHR	Spontaneous Hypertension hyperlipideamic	Yes	Yes	Yes	Hyperfibrinogenemia, hypercoagulation	Hypertension, hyperlipidemia and theirs interactions with coagulation	[42, 80, 99]
<b>Mice</b>							
Lep <sup>ob/ob</sup>	Leptin-deficient mice	Yes	Yes	Yes	Less thrombosis,	Hypertension, coagulation, and their interaction with MetS	[82, 83, 87, 89]
Lep <sup>Rdb/db</sup>	Leptin receptor-deficient mice	Yes	Yes	Yes	Less thrombotic following onset of vascular injury hypertensive	Hypertension, coagulation, and their interaction with MetS	[13, 14, 83, 90]
Ldlr <sup>-/-</sup> Lep <sup>ob/ob</sup> Apob48 <sup>-/-</sup> Lep <sup>ob/ob</sup> mice	Leptin and Leptin receptor deficient mice	Yes	Yes	Yes	ND	MetS and its interactions with hypertension	[92]
New Zealand obese mice	Leptin receptor-mutant mice	Yes	Yes	Yes	ND	MetS, hyperlipidemia and their interactions with hypertension	[93, 94]

Figure 1

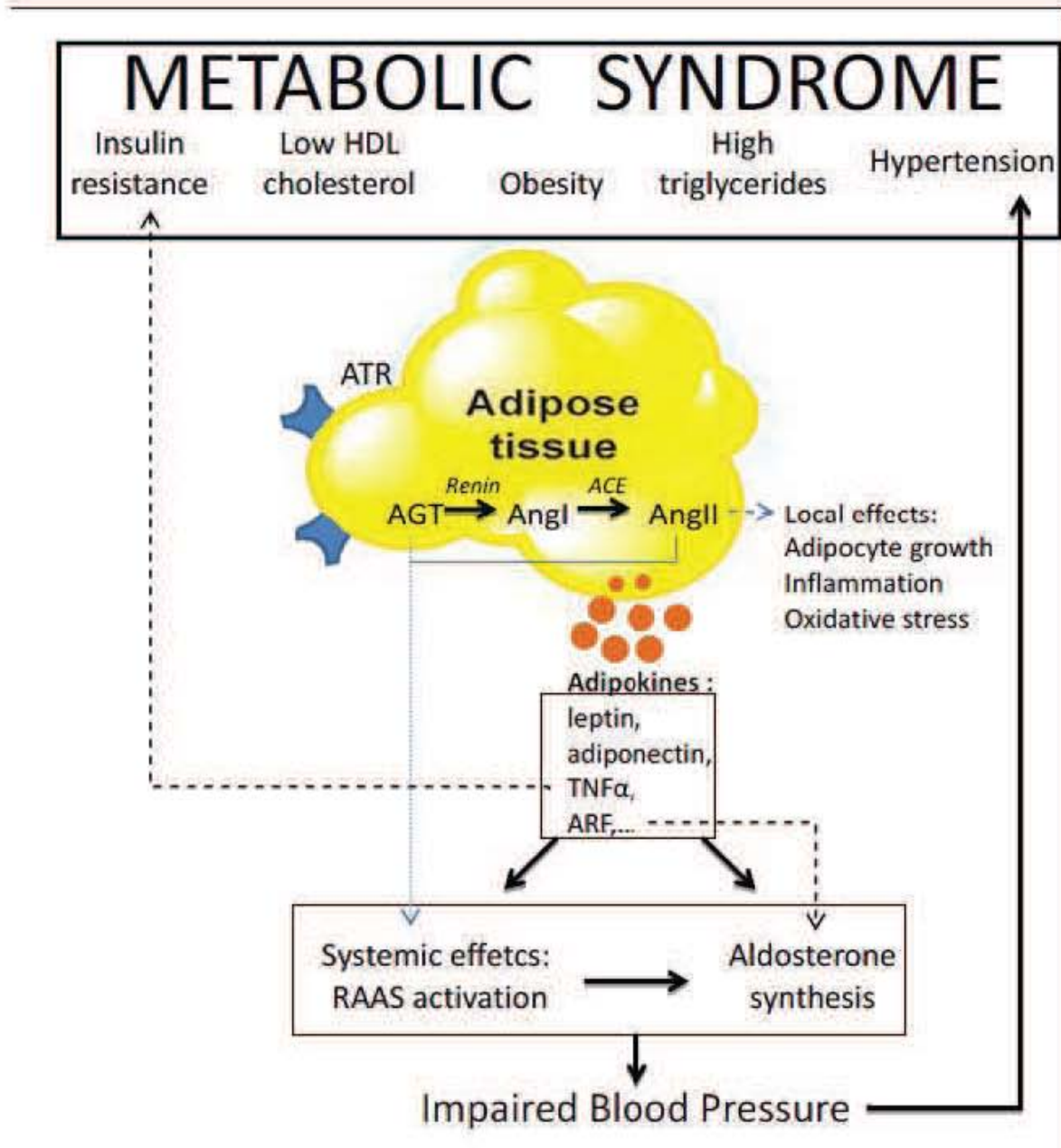
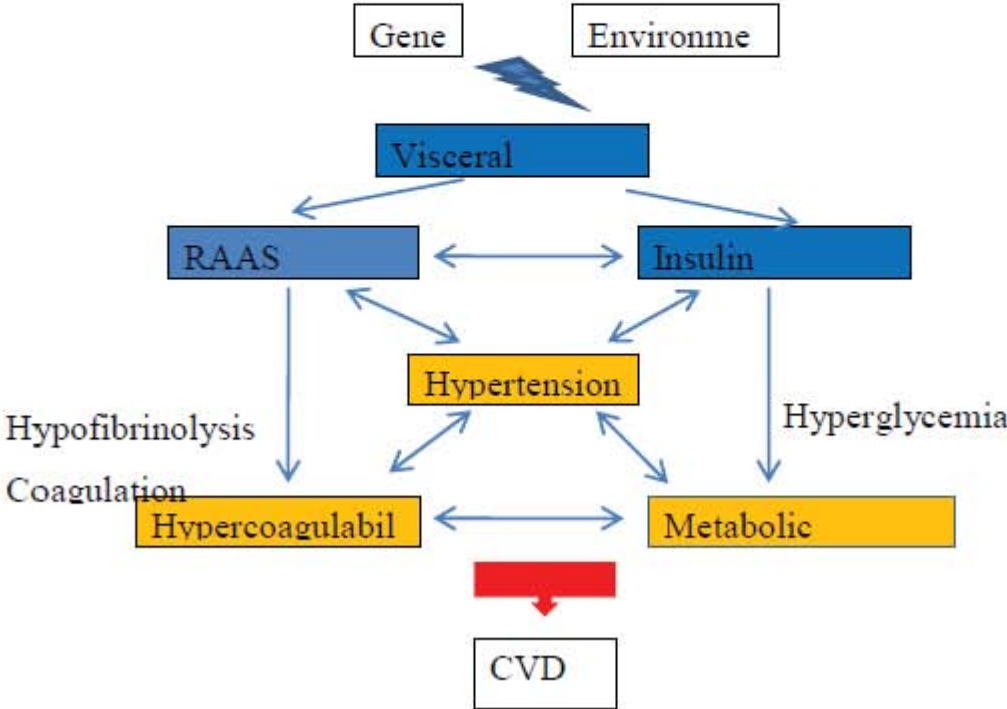


Figure 2



## Résumé

L'hypothèse que l'hypertension peut conférer un état d'hypercoagulabilité découle des principales complications liées à l'hypertension, l'infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral. Notre objectif était de déterminer si l'hypertension spontanée confère des changements dans les protéines de la coagulation et de la capacité de production de thrombine dans le sang et la paroi vasculaire.

Nous avons utilisé le modèle de rats spontanément hypertendus (SHR) par rapport aux rats Wistar. La génération de thrombine est plus faible dans le plasma riche en plaquettes et plasma sans plaquettes de SHR par rapport à Wistar. Ceci est lié aux faibles concentrations en facteur tissulaire (TF) et en prothrombine, ainsi qu'un taux plus élevé de TFPI dans le plasma des SHR. En revanche, l'ajout d'anneaux d'aorte thoracique de SHR à un pool de plasma Wistar a donné lieu à une augmentation plus importante dans la génération de thrombine par rapport à l'ajout d'anneaux équivalent du Wistar. Alors qu'aucune différence n'a été observée pour les cellules endothéliales, la formation de thrombine était plus élevée à la surface de culture CML aortiques des SHR que des Wistar. L'exposition des phospholipides chargés négativement est plus élevée sur les anneaux et les CML des SHR que les Wistar. Les activités TF et TFPI étaient plus élevées chez les CML des SHR. Ces résultats montrent une opposition de génération de thrombine à la surface de la paroi artérielle et dans le plasma des rats SHR par rapport aux rats Wistar. Le phénotype thrombotique plus élevé de la paroi vasculaire SHR est dû à la capacité du CML à soutenir la génération de thrombine. Ces résultats suggèrent que le remodelage de la membrane phospholipidique et la synthèse de molécules pro-coagulantes induites par hypertension dans les CML sont des substrats pour une formation de thrombine accrue dans la paroi vasculaire.

**Mots Clés :** Rat spontanément hypertendu, cellules musculaires lisses vasculaires, génération de thrombine, facteur tissulaire, hypercoagulabilité.

## Abstract

The hypothesis that hypertension may confer a hypercoagulable state arises from the main complications associated with hypertension, stroke and myocardial infarction. Our objective was to determine whether spontaneous hypertension confers changes in the coagulation proteins and the thrombin generating capacity in blood and the vascular wall.

We used the model of spontaneously hypertensive rats (SHR) compared with Wistar rats. Thrombin generation was lower in platelet-rich plasma and platelet-free plasma from SHR compared to Wistar. This was related to lower tissue factor (TF) and prothrombin as well as higher TFPI levels in SHR plasma. In contrast, the addition of thoracic aorta rings of SHR to a Wistar plasma pool resulted in a higher increase in thrombin generation compared to the addition of equivalent rings from Wistar. Whereas no difference was observed for endothelial cells, thrombin formation was higher at the surface of cultured SHR aortic SMCs than from Wistar. Exposure of negatively-charged phospholipids was higher on SHR than on Wistar rings as well as on SMCs. TF and TFPI activities were higher in SHR SMCs. These results show opposite thrombin generating capacity of plasma and vessel walls in SHR compared to Wistar. The higher prothrombotic phenotype of the SHR vessel wall was due to the ability of SMCs to support thrombin generation. These findings suggest that the hypertension-induced membrane phospholipid reorganization and synthesis of procoagulant molecules in SMCs provide substrates for increased thrombin formation within the vessel wall.

**Keywords:** Spontaneously hypertensive rat, vascular smooth muscle cells, thrombin generation, tissue factor, hypercoagulability.