



**HAL**  
open science

# Changements hémostatiques du syndrome métabolique, de l'hypertension artérielle, et de l'insuffisance cardiaque : approches physiologique et physiopathologique

Jérémy Lagrange

► **To cite this version:**

Jérémy Lagrange. Changements hémostatiques du syndrome métabolique, de l'hypertension artérielle, et de l'insuffisance cardiaque : approches physiologique et physiopathologique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0160 . tel-01750341

**HAL Id: tel-01750341**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750341>**

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>

**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

**Jérémy LAGRANGE**

**Changements hémostatiques du syndrome métabolique, de  
l'hypertension artérielle, et de l'insuffisance cardiaque :  
approches physiologique et physiopathologique**

Date de soutenance : 3 décembre 2013

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :**

**M Stéphane LAURENT** « PU-PH, INSERM U970, Paris »

**M Peter LENTING** « Directeur de recherche, INSERM U770, Paris »

**Examineurs :**

**M Bruno FEVE** « PU-PH, UMPC, Paris »

**M Denis WAHL (Président du jury)** « PU-PH, INSERM U1116, Nancy »

**M Patrick LACOLLEY** « Directeur de recherche, INSERM U1116, Nancy »  
directeur de thèse

**Mme Véronique REGNAULT** « Chargé de recherche, INSERM U1116, Nancy »  
co-directeur de thèse

---

-----  
Travail effectué au laboratoire INSERM 1116 « défaillance cardiovasculaire aiguë et  
chronique », Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, Université de Lorraine

Je voudrais remercier en premier lieu mes deux directeurs de thèse qui ont tout fait pour le bon déroulement de cette thèse :

- Je remercie le Dr **Patrick LACOLLEY**, directeur de l'unité où s'est déroulé ce travail de thèse et directeur de cette thèse de m'avoir fait l'honneur de m'accueillir dans son unité. Je lui suis très reconnaissant pour tout ce qu'il a fait pour moi, de l'obtention d'une bourse de thèse à tous ses conseils pour bien présenter un travail. Je le remercie pour son dynamisme, son implication dans mon travail et sa rigueur, tout ce qu'il m'a appris me sera nécessaire pour réussir dans le monde de la recherche.

- Je remercie le Dr **Véronique REGNAULT**, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance depuis mon M2 et m'avoir encadré durant tout ce travail de thèse. Son aide scientifique, ses conseils dans toutes les étapes de cette thèse et sa disponibilité toutes les fois où je l'ai dérangée « deux minutes » pour répondre à mes questions m'ont été d'un très grand soutien durant ces années passées dans l'unité. Je la remercie également pour tous ses conseils et tout ce qu'elle m'a appris sur le monde de la science.

Merci également pour toutes les fois où j'ai pu me rendre à des congrès ces trois dernières années. Je n'ai jamais autant voyagé que durant ma thèse ! Peu de doctorants ont la chance de pouvoir présenter aussi souvent leurs travaux et j'ai beaucoup appris en rencontrant d'autres scientifiques.

Je tiens à remercier le Pr **Stéphane LAURENT**, pour l'honneur qu'il me fait d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je tiens à remercier le Dr **Peter LENTING** pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude et de l'expression de tous mes remerciements.

Je tiens à remercier le Pr **Bruno FEVE**, pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examinateur. Je le remercie également sincèrement pour tous les conseils et toutes les idées qu'il a pu apporter durant ce travail en tant que membre de mon comité de suivi de thèse.

Je tiens à remercier le Pr **Denis WAHL** de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je le remercie également très chaleureusement pour toute l'aide scientifique et tous les conseils qu'il a pu me prodiguer tout au long de cette thèse.

J'adresse mes remerciements au Dr **Frédéric JAISSER** pour ses conseils concernant le projet portant sur les souris MR-EC et lors de la rédaction de l'article associé. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude et de l'expression de tous mes remerciements.

Je remercie le Pr **Jacques MAGDALOU** d'avoir suivi ce travail en tant que membre du comité de suivi de thèse et pour tous ses conseils.



J'adresse mes remerciements au Dr **Jean-Pierre MAX** le grand technicien scientifique de ce travail ! Je le remercie pour sa grande disponibilité, ses remarques réfléchies et son regard critique qui ont permis à ce travail d'avancer dans la bonne voie. Etant le dernier thésard qu'il aura eu à « supporter » avant sa retraite je lui souhaite de bonnes et longues marches !

Je remercie le Dr **Huguette LOUIS** de m'avoir appris toutes les expériences de biologie moléculaire et cellulaire, et pour toute la patience dont elle a fait preuve, et de m'avoir directement épaulé lorsque j'étais à court de temps.

Merci également à **Cécile LAKOMY** pour son aide technique et sa réactivité!

I would like to thank the Pr **Simon THORNTON** for his availability every time I asked to him for English abstract or poster corrections. I am very thankful for every conversation we had regarding university and its functioning. If I could tell to the student I was in second year of University that I would eventually be a PhD student! He would probably not believe it as he didn't believe the professor who told the class that doing a PhD is a great experience! And finally, I did my PhD thesis in the same lab than this professor!

Je remercie le Dr **Karima Ait-Aissa** ma collègue de bureau de 3 ans pour m'avoir supporté ! Je la remercie également pour toutes les relectures de mails et toutes les conversations que nous avons pu avoir sur tous les sujets possibles et imaginables !

Je remercie le Dr **Mustapha Bourhim** pour tous ses conseils. Merci également d'avoir pris le temps de m'expliquer quelques grandes règles, techniques et manière de réfléchir en biochimie et biologie cellulaire.

Je veux remercier le Dr **Zhenlin LI** pour toute l'aide qu'il a apporté lors des expériences sur les aortes des souris MR-EC et les cellules endothéliales traitées à l'aldostérone. Je le remercie pour toutes ses idées, ses conseils, et sa très grande réactivité.

Je tiens à remercier **Anne-Laure LEBLANC** pour toute son aide et sa très bonne gestion de la colonie des rats Zucker.

Merci au Dr **Michèle MARTIN** pour ses conseils et pour la mise au point du test fibrinolytique chez le rat.

Je remercie SD-innovation et tout particulièrement **Ismaël DIDELON** et **Julien COLIN** grâce à qui nous avons maintenant la possibilité de faire des agrégations plaquettaires au laboratoire.

Merci au Dr **Marie HACQUARD** de m'avoir ouvert les portes du service d'hématologie biologique-hémostase médicale du CHRU de Nancy pour faire les expériences d'agrégation plaquettaire lorsque nous n'en avions pas la possibilité au laboratoire.

Je remercie également **Saartje BLOEMEN** pour les expériences de microscopie confocale qu'elle a réalisées dans son unité à Maastricht et toutes les réponses qu'elle a pu apporter à mes nombreuses questions.

Je tiens à remercier tous les doctorants que j'ai pu rencontrer au laboratoire. Le Dr **Rose SAÏD**, le Dr **Xianqing MAO**, le Dr **Natacha SLOBODA**...qui m'ont accueilli lors de mon arrivée en M2 il y a 4 ans. **Anna FILIP**, le Dr **Batric POPOVIC**, **Gina YOUCEF**, le Dr **Laurent CALVIER**..., avec qui j'ai partagé les salles de manips durant toute la durée de ce travail. Je souhaite bonne chance aux nouveaux doctorants qui commencent leur doctorat, **Amel MOHAMADI**, le Dr **Ekaterina BELOZERTSEVA**... Je remercie également tous les autres étudiants qui ont partagé mon bureau et à qui j'ai pu expliquer quelques expériences, **Cécile HUPPERT**, **Clémence DOCQ**, **Loïc LEGAL**, **Marie DE SEZE**...

Je remercie tous les membres de l'Unité U1116 (ex U961) pour leur soutien et leurs conseils durant ces 4 années passées au laboratoire, le Dr **Anne PIZARD**, le Dr **Carlos LABAT**, **Elodie ROUSSEAU**, le Dr **Zhor RAMDANE-CHERIF**, le Dr **Natalia LOPEZ**, le Dr **Natalie Mercier**, le Dr **Simon TOUPANCE**, **Véronique LAPLACE**...Merci à **Audrey ISCH** pour tous ses conseils notamment au niveau des bonnes personnes à contacter au niveau de l'Université lors de la mise en place de l'association des doctorants.

Je remercie le Dr **Dominique CHARDARD** de m'avoir permis de découvrir ce que c'était de se retrouver de l'autre côté du bureau en face d'une classe d'étudiants.

Je tiens également à remercier l'ancien directeur, le Pr **Jean-Yves JOUZEAU**, l'actuel directeur, le Pr **Patrick MENU**, et la secrétaire, Mme **Hélène Primerano**, de l'école doctorale BioSE de pour leur soutien et leur encouragement lors de la création de l'association des doctorants.

Je voudrais enfin remercier la **Région Lorraine** et la **CUGN** qui ont financé mes trois années de thèse.

Je remercie mes parents de m'avoir toujours laissé faire ce que je voulais et de m'avoir aidé à faire des études longues. Je les remercie également pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté pour meubler et refaire le local de l'association des doctorants.

Je remercie le **garage Lagrange Frère d'Aydoilles (88)** pour m'avoir payé l'essence me permettant de revenir me changer les idées les week-ends chez moi dans les Vosges lorsque je le pouvais.

Merci à mes amis vosgiens, **JC, Nicolas, Romain, Sébastien**...Merci pour toutes ces années à Aydoilles, tous ces 21, tous ces zombies massacrés ! Même si je pars loin je reviendrai les 14 juillet ! Vivement que nous ayons assez d'argent pour nous acheter un chalet de vacances dans les Hautes-Vosges !

Merci aux joueurs de l'AS Aydoilles pour ces 3 dernières années et tous ces matchs et ces dimanches après-midi à arpenter les « terrains » de foot vosgiens.

Merci à mes amis du lycée qui m'ont toujours encouragé durant cette thèse, **Frédérique, Lisa, Matthieu, Simon**...

Merci à mes amis Nancéens, du début de l'Université de m'avoir supporté (dans tous les sens du terme) **Aurélié, Antony, Rémi**...et ceux qui ont continué dans le filière pour devenir enseignant dans le secondaire, **Gasmichto, Toto, Marty, Roro**, Les « grosses » **Marion/Marjo, Alysson**...Bon courage à vous tous !

Merci beaucoup à tous les membres actifs de l'association A-Team of BioS ([www.ateamofbios.fr](http://www.ateamofbios.fr)), **Antoine, Magali, Marianne, Maxime, Mélissa, Sophie, Thomas, Yoann**... Merci pour tout votre travail ! L'Association des Doctorants en Biologie et Santé que nous avons créée pour nous retrouver entre doctorants, échanger les informations et sortir un peu du laboratoire ! Merci pour tous les bons moments passés ensemble. Faites en sorte que l'association perdure !

Bon courage également à tous les jeunes de la faculté de Sciences que j'ai pu rencontrer grâce à l'association, **Alexandra, David, Fabrice, Juliette, Leïla, Marine**...Bon courage pour vos études !

Enfin merci à mes amis qui ont pris de leur temps pour relire ce travail **Pierrick** ([www.jeancolas-traduction.com/](http://www.jeancolas-traduction.com/)) **Kelly** et **Vassili** !

A mes grands-parents à qui je dédie ce travail.

## SOMMAIRE

<b>I. CONTEXTE DU SUJET .....</b>	<b>11</b>
<b>II. POSITION DU SUJET .....</b>	<b>12</b>
<b>II.1. Les vaisseaux sanguins .....</b>	<b>12</b>
<b>II.2. Les cellules de la paroi vasculaire .....</b>	<b>14</b>
II.2.1. Les cellules musculaires lisses (CML) .....	14
II.2.2. Les cellules endothéliales (CE) .....	14
II.2.3. Les marqueurs et l'évaluation de l'état de l'endothélium .....	16
II.2.4. La régulation de la vaso-réactivité par l'endothélium .....	17
II.2.5. L'implication des CML dans l'hémostase .....	20
<b>II.3. L'hémostase.....</b>	<b>22</b>
II.3.1. La fonction plaquettaire.....	23
II.3.1.1. L'activation plaquettaire en réponse à une brèche vasculaire .....	23
II.3.1.2. L'Adhérence et le changement de forme .....	23
II.3.1.3. L'agrégation plaquettaire.....	26
II.3.1.4. La sécrétion.....	27
II.3.1.5. La microvésiculation .....	29
II.3.2. Le système de la coagulation.....	29
II.3.2.1. Les protéines de la coagulation.....	29
II.3.2.2. Les différentes étapes de la coagulation .....	39
II.3.3. La fibrinolyse .....	44
<b>II.4. Le système rénine angiotensine aldostérone (RAA) .....</b>	<b>47</b>
II.4.1. Définition .....	47
II.4.2. L'aldostérone et son récepteur : le récepteur minéralocorticoïde (MR).....	48
II.4.2.1. Le rôle historique du couple aldostérone/RM.....	48
II.4.2.2. L'aldostérone et le RM .....	52
II.4.2.3. L'impact de l'aldostérone sur l'hémostase .....	54
<b>II.5. Le syndrome métabolique (SMet) .....</b>	<b>54</b>
II.5.1. L'altérations métaboliques et l'inflammation dans le cadre du SMet .....	57
II.5.2. L'impact du SMet sur l'hémostase.....	60
<b>II.6. L'hypertension artérielle (HTA) .....</b>	<b>61</b>
II.6.1. Définition de l'HTA .....	61
II.6.2. Les modifications fonctionnelles et structurales des gros troncs artériels avec le vieillissement .....	62
II.6.2.1. Augmentation de la pression pulsée (PP) .....	64
II.6.2.2. Augmentation de la vitesse d'onde de pouls (VOP).....	65

II.6.3. L'impact de l'hypertension sur l'hémostase.....	65
II.6.4. L'impact du vieillissement sur l'hémostase .....	66
<b>II.7. L'insuffisance cardiaque (IC).....</b>	<b>68</b>
II.7.1. Définition de l'IC .....	68
II.7.2. L'impact de l'IC sur l'hémostase .....	71
<b>III. MODELES D'ETUDES.....</b>	<b>74</b>
<b>III.1. Les modèles murins de SMet .....</b>	<b>74</b>
<b>III.2. Le rat Zucker résistant à la leptine comme modèle de SMet.....</b>	<b>75</b>
III.2.1. La leptine et son récepteur .....	76
III.2.2. L'impact de la leptine sur l'hémostase .....	77
<b>III.3. Le modèle du rat spontanément hypertendu (SHR) .....</b>	<b>77</b>
<b>III.4. La souris surexprimant le RM dans l'endothélium .....</b>	<b>78</b>
<b>III.5. Les cohortes de patients atteints d'IC traitées avec un antagoniste du RM .....</b>	<b>80</b>
<b>IV. HYPOTHESES ET OBJECTIFS .....</b>	<b>81</b>
<b>V. STRATEGIES D'ETUDE .....</b>	<b>82</b>
<b>VI. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>84</b>
<b>VI.1. Les animaux .....</b>	<b>84</b>
VI.1.1. Les rats Zucker.....	84
VI.1.2. Les rats SHR .....	84
VI.1.3. Les souris RM-CE et les souris traitées à l'aldostérone.....	84
<b>VI.2. Les patients de l'étude EPHEBUS.....</b>	<b>85</b>
<b>VI.3. Les prélèvements .....</b>	<b>86</b>
VI.3.1. La Préparation du plasma dépourvu de plaquettes (PDP).....	86
VI.3.2. La préparation du plasma riche en plaquettes (PRP) .....	86
VI.3.3. Les prélèvements de tissus et d'organes .....	87
<b>VI.4. Le phénotypage de l'hémostase .....</b>	<b>87</b>
VI.4.1. L'évaluation de la réactivité plaquettaire.....	87
VI.4.1.1. Agrégation plaquettaire.....	87
VI.4.1.2. Les dosages des sécrétions plaquettares.....	88
VI.4.2. La génération de thrombine en plasma ou à la surface de cellules .....	88
VI.4.3. Les dosages.....	91
VI.4.3.1. Les dosages par test ELISA .....	91
VI.4.3.2. Le dosage du fibrinogène coagulant .....	92
VI.4.3.3. Le dosage de la prothrombine et du FVIII .....	93
VI.4.3.4. Le dosage de l'activité procoagulante des phospholipides .....	93

VI.4.4. La mesure de la conversion de protéine C (PC) en PC activée (PCa) à la surface des CE.....	94
VI.4.5. Le test de fibrinolyse.....	95
VI.5. Imagerie des caillots de fibrine. Le test de fibrinolyse.....	95
<b>VI.6. Le modèle de thrombose carotidienne induite au FeCl<sub>3</sub> .....</b>	<b>956</b>
<b>VI.7. La culture cellulaire.....</b>	<b>96</b>
VI.7.1. L'isolement et la culture de cellules endothéliales (CE) et de CML de rats SHR .....	96
VI.7.2. La culture de CE aortiques humaines (HAEC).....	98
<b>VI.8. Extraction de l'ARN et la mesure de l'expression des gènes .....</b>	<b>99</b>
<b>VI.9. L'immunohistochimie et l'immunocytochimie .....</b>	<b>100</b>
<b>VI.10. Les statistiques.....</b>	<b>100</b>
<b>VII.RESULTATS.....</b>	<b>102</b>
<b>VII.1. L'Etude de l'hémostase du rat Zucker.....</b>	<b>102</b>
VII.1.1. Les paramètres morphologiques, hémodynamiques et métaboliques .....	102
VII.1.2. La numération sanguine.....	102
VII.1.3. Les dosages des facteurs de la coagulation.....	105
VII.1.4. La génération de thrombine en PDP et PRP .....	107
VII.1.5. L'agrégation plaquettaire.....	111
VII.1.6. La fibrinolyse.....	112
VII.1.6.1. Le test fibrinolytique.....	112
VII.1.6.2. L'analyse des caillots par microscopie.....	114
VII.1.7. L'impact du fibrinogène sur la génération de thrombine.....	115
VII.1.8. L'implication des adipokines et des cytokines dans la génération de thrombine .....	1166
<b>VII.2. L'Etude de l'hémostase du rat SHR.....</b>	<b>1188</b>
VII.2.1. Les paramètres morphologiques et la numération sanguine .....	1188
VII.2.2. Les dosages des facteurs de la coagulation.....	119
VII.2.3. La génération de thrombine en PDP et PRP .....	120
VII.2.4. La génération de thrombine à la surface des anneaux aortiques.....	122
VII.2.5. La génération de thrombine à la surface des cellules vasculaires.....	123
<b>VII.3. Le phénotypage de l'hémostase des modèles activant le couple aldostérone/MR.....</b>	<b>124</b>
VII.3.1. L'étude de l'hémostase des souris traitées à l'aldostérone .....	125
VII.3.1.1. L'agrégation plaquettaire .....	125
VII.3.1.2. La génération de thrombine en PDP .....	126
VII.3.1.3. Le modèle de thrombose carotidienne des souris traitées à l'aldostérone .....	127
VII.3.2. L'étude de l'hémostase des souris RM-CE.....	128
VII.3.2.1. La numération sanguine des souris RM-CE.....	128
VII.3.2.2. La génération de thrombine en PDP .....	129

VII.3.2.3. L'agrégation et les sécrétions plaquettaire .....	130
VII.3.2.4. Les dosages de protéines plasmatiques et aortiques impliquées dans le système de la coagulation .....	131
VII.3.2.5. Expression du récepteur de la PC (EPCR) par microscopie confocale .....	132
VII.3.2.6. Le modèle de thrombose carotidienne des souris RM-CE .....	133
<b>VII.4. Les HAECs traitées à l'aldostérone .....</b>	<b>134</b>
VII.4.1. La génération de thrombine à la surface des HAEC traitées à l'aldostérone .....	134
VII.4.2. La quantification des protéines anticoagulantes de l'endothélium .....	137
VII.4.3. Expression de l'EPCR et la thrombomoduline dans les HAECs .....	138
VII.4.4. L'implication du système de la PCa .....	139
VII.4.5. La mesure de la conversion de PC en PCa .....	139
<b>VII.5. L'étude de la rigidité artérielle de la cohorte humaine : l'étude EPHEsus .....</b>	<b>140</b>
VII.5.1. Les paramètres généraux .....	140
VII.5.2. L'association entre la PP et les événements cardiovasculaires .....	143
VII.5.3. Déterminant de la PP et de la VOP .....	144
VII.5.4. Résultats préliminaire de coagulation .....	145
<b>VIII. DISCUSSION .....</b>	<b>146</b>
<b>IX. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>157</b>
<b>X. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>159</b>
<b>XI. ARTICLES ET COMMUNICATIONS EN CONGRES .....</b>	<b>175</b>



## Index des figures et des tableaux

<b>Figure 1 :</b> Structure de la paroi artérielle.....	12
<b>Figure 2 :</b> structures et fonctions des différents types d'artères composant l'arbre vasculaire .....	13
<b>Figure 3 :</b> Actions des CE (cellules endothéliales).....	15
<b>Figure 4 :</b> Interactions entre les CE, les CML.....	19
<b>Figure 5 :</b> Transfert bidirectionnel des facteurs de coagulations entre la paroi artérielle et le sang.....	22
<b>Figure 6 :</b> Les différentes voies d'activation plaquettaire. ....	25
<b>Figure 7 :</b> Les différentes étapes de l'actiations plaquettaire. ....	28
<b>Figure 8 :</b> Réaction de carboxylation des protéines vitamine-K dépendantes.....	31
<b>Figure 9 :</b> Modélisation du complexe formé par les protéines vitamine K-dépendantes à la surface des phospholipides (exemple de la prothrombine) .....	32
<b>Figure 10 :</b> Structure du fibrinogène et de la fibrine. ....	34
<b>Figure 11 :</b> Inhibition du facteur tissulaire, des FVIIa et FXa par le TFPI (inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, FT).....	36
<b>Figure 12 :</b> Modélisation de la PC (protéine C) liée à l'EPCR (récepteur endothélial de la protéine C)..	37
<b>Figure 13 :</b> Structure et interaction des molécules anticoagulantes.....	38
<b>Figure 14 :</b> Structure de la prothrombine .....	40
<b>Figure 15 :</b> Initiation et de amplification de la coagulation.....	41
<b>Figure 16 :</b> Structure et activation de la PC en PCa. ....	43
<b>Figure 17 :</b> Produits de dégradation de la fibrine après protéolyse par la plasmine .....	44
<b>Figure 18 :</b> Système de l'urokinase (uPA) et de son récepteur (uPAR). ....	45
<b>Figure 19 :</b> Schéma général de la fibrinolyse. ....	46
<b>Figure 20 :</b> Régulation de la volémie par le système rénine/angiotensine/aldostérone. ....	48
<b>Figure 21 :</b> Action de l'aldostérone sur le récepteur minéralocorticoïde (RM). ....	49
<b>Figure 22 :</b> Actions des enzymes 11 $\beta$ -HSD1 (11 $\beta$ -Hydroxystéroïde dehydrogénase) type 1 et 2 .....	51
<b>Figure 23 :</b> Prévalence du syndrome métabolique. ....	56
<b>Figure 24 :</b> Prévalence du syndrome métabolique à Mexico en fonction de la définition utilisée.....	57
<b>Figure 25 :</b> Relations existantes entre les molécules synthétisées par le tissu adipeux et les autres organes. ....	58
<b>Figure 26 :</b> Mise en place et l'amplification de l'inflammation chronique dans le syndrome métabolique. ....	59
<b>Figure 27 :</b> Modification de l'effet « Windkessel » avec le vieillissement. ....	63
<b>Figure 28 :</b> Schéma de la pression pulsée.....	64
<b>Figure 29 :</b> Incidence de la première thrombose veineuse en fonction de l'âge et du sexe.....	66
<b>Figure 30 :</b> Schéma du développement de thromboses veineuses.....	67
<b>Figure 31 :</b> Les différents paradigmes de la progression de l'insuffisance cardiaque.....	69
<b>Figure 32 :</b> Altération de la fonction cardiaque lors de la mise en place d'une insuffisance cardiaque.....	70
<b>Figure 33 :</b> Mutation du récepteur à la leptine dans les modèles murins d'obésité.....	76
<b>Figure 34 :</b> Schéma de la stratégie d'étude.....	83
<b>Figure 35 :</b> Génération de souris surexprimant de manière conditionnelle le RM humain dans l'endothélium.....	85

**Figure 36 :** Les paramètres de la génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes sur un pool de 10 plasmas humain. .... 90

**Figure 37 :** Courbes typiques de génération de thrombine chez les rats Zucker obèses et non obèses. ... 109

**Figure 38 :** Agrégation des plaquettes des rats Zucker obèses et non obèses. .... 111

**Figure 39 :** Courbes de fibrinolyse chez les rats Zucker obèses et non obèses. .... 112

**Figure 40 :** Images et quantification du réseau de fibrine chez les rats obèses et non obèses. .... 114

**Figure 41 :** Corrélations entre l’ETP et le fibrinogène. .... 115

**Figure 42 :** Valeur d’ETP dans les PDP de rats Zucker obèses et non obèses. .... 116

**Figure 43 :** Corrélations entre l’adiponectine et l’activité du TFPI. .... 116

**Figure 44 :** Valeurs d’ETP dans les PPP de rats Zucker non obèse avec ajout d’adipokines. .... 117

**Figure 45 :** Array de cytokines chez les rats Zucker âgés de 25 et 80 semaines. .... 118

**Figure 46 :** Valeur d’ETP dans les PRP et PDP, en réponse à une stimulation par du FT, des rats SHR et Wistar de 5 et 12 semaines. .... 122

**Figure 47 :** Courbes représentatives de génération de thrombine et valeurs d’ETP à la surface d’anneaux aortiques de rats SHR et Wistar ajouté à un pool de PDP de rats Wistar ou SHR. .... 123

**Figure 48 :** Courbes représentatives de génération de thrombine et ETP des générations de thrombine réalisée à la surface de CML et de CE de rats SHR et Wistar de 12 semaines. .... 124

**Figure 49 :** Courbes d’agrégation plaquettaire et valeurs d’agrégation maximale des plaquettes de souris traitées à l’aldostérone. .... 125

**Figure 50 :** Thrombinographie en PDP avec et sans TM, et paramètres de thrombinographie des souris traitées à l’aldostérone. .... 126

**Figure 51 :** Courbe de flux sanguin dans la carotide droite et temps d’occlusion dans un modèle de thrombose chez les souris traitées à l’aldostérone. .... 127

**Figure 52 :** Thrombinographie en PDP avec et sans TM, et paramètres de thrombinographie des souris RM-CE. .... 129

**Figure 53 :** Courbes d’agrégation plaquettaire, agrégation maximale et dosages des sécretions plaquettaire des RM-CE. .... 130

**Figure 54 :** Immunohistochimie de l’EPCR sur les coupes aortiques des souris RM-CE. .... 132

**Figure 55 :** Courbes de flux sanguin et temps d’occlusion dans un modèle de thrombose chez les souris RM-CE. .... 133

**Figure 56 :** Génération de thrombine à la surface des HAECs. .... 135

**Figure 57 :** Quantification de l’expression de l’ARN et des protéines anticoagulantes par les HAECs traitées à l’aldostérone. .... 137

**Figure 58 :** Immunocytochimie pour l’EPCR et la TM à la surface des HAECs traitées à l’aldostérone. 138

**Figure 59 :** Courbe de génération de thrombine à la surface de CE traitées et non traitées à l’aldostérone en présence d’un anti-TM ou avec un plasma déficient en PC. .... 139

**Figure 60 :** Mesure de la conversion de PC en PCa à la surface des HAECs. .... 140

**Figure 61 :** Courbe typique de génération de thrombine en présence de PCa d’un patient atteint d’IC et d’un témoin. .... 145

**Figure 62 :** Schéma de l’action de l’aldostérone dans la régulation de l’hémostase dans un contexte physiologique. .... 153

<b><u>Tableau 1</u></b> : Les protéines de la coagulation.....	30
<b><u>Tableau 2</u></b> : Augmentation de l'activation des zymogènes en présence de composés formant les complexes d'activation.....	33
<b><u>Tableau 3</u></b> : Classification des 4 stades de l'IC selon la NYHA (New York Heart Association).....	71
<b><u>Tableau 4</u></b> : Etudes ayant utilisées des traitements antithrombotiques dans l'IC.....	73
<b><u>Tableau 5</u></b> : Résumé des différentes anomalies qui caractérisent les rats utilisés comme modèles de l'interaction entre le syndrome métabolique et l'hémostase.....	75
<b><u>Tableau 6</u></b> : Modèles de souris transgéniques pour le récepteur minéralocorticoïde au niveau cardiovasculaire et leurs phénotypes.....	79
<b><u>Tableau 7</u></b> : Séquence des amorces.....	99
<b><u>Tableau 8</u></b> : Paramètres morphologiques, hémodynamiques et métaboliques des rats Zucker obèses et non obèses.....	104
<b><u>Tableau 9</u></b> : Numération sanguine des rats Zucker obèses et non obèses.....	104
<b><u>Tableau 10</u></b> : Paramètres hémostatiques des rats Zucker obèses et non obèses.....	106
<b><u>Tableau 11</u></b> : Paramètres de génération de thrombine dans le PDP des rats Zucker obèses et non obèses.....	108
<b><u>Tableau 12</u></b> : Paramètres de la génération de thrombine dans le PRP des rats Zucker obèses et non obèses.....	110
<b><u>Tableau 13</u></b> : Paramètres de la fibrinolyse chez les rats Zucker obèses et non obèses.....	113
<b><u>Tableau 14</u></b> : Paramètres morphologiques et numération sanguine des rats SHR et Wistar de 5 et 12 semaines.....	119
<b><u>Tableau 15</u></b> : Dosage des facteurs de la coagulation des rats SHR.....	119
<b><u>Tableau 16</u></b> : Génération de thrombine chez les rats SHR.....	121
<b><u>Tableau 17</u></b> : Numération sanguine des souris RM-CE.....	131
<b><u>Tableau 18</u></b> : ELISA des marqueurs endothéliaux des souris RM-CE.....	130
<b><u>Tableau 19</u></b> : Paramètres de courbes de génération de thrombine à la surface des HAECs.....	136
<b><u>Tableau 20</u></b> : Paramètres des patients de l'étude EPHEBUS.....	142
<b><u>Tableau 21</u></b> : Association entre la PP et le risque d'événements cardiovasculaires.....	143
<b><u>Tableau 22</u></b> : Paramètres expliquant les variations de pression pulsée et de la vitesse d'onde de pouls.....	144

## Liste des abréviations

<b><math>\alpha_2</math>-MG</b>	$\alpha_2$ -macroglobuline
<b><math>\alpha_2</math>-PI</b>	Inhibiteur $\alpha_2$ plasmine
<b>AA</b>	Acide arachidonique
<b>ADAM17 ou TACE</b>	Enzyme de conversion du TNF- $\alpha$
<b>AMPc</b>	Adénosine mono-phosphate cyclique
<b>APO-E</b>	Apolipoprotéine-E
<b>AT</b>	Antithrombine
<b>AT-II</b>	Angiotensine II
<b>AT1, AT2</b>	Récepteur à l'angiotensine de type 1 et de type 2
<b>AVC</b>	Accident vasculaire cérébrale
<b>BK</b>	Canaux calcique BK
<b>CalDAG-GEFI ou Vav2</b>	Facteur d'échange des guanines
<b>CBP</b>	Protéine de liaison CREB
<b>CE</b>	Cellules endothéliales
<b>cGMP</b>	Guanosine monophosphate cyclique
<b>CML</b>	Cellules musculaires lisses
<b>CO</b>	Monoxyde de carbone
<b>COX</b>	Cyclo-oxygénase
<b>CYP</b>	Cytochrome P450
<b>DAG</b>	Diacyglycérol
<b>DST</b>	Système tubulaire dense
<b>ECA</b>	Enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>EDHF</b>	Facteur endothelial hyperpolarisant
<b>EGF</b>	Facteur de croissance épithélial
<b>EGFR</b>	Facteur de croissance épidermique
<b>ENaC</b>	Canal épithélial sodique
<b>eNOS</b>	NOS endothéliale
<b>EPCR</b>	Récepteur endothélial de la protéine C
<b>ERK</b>	Kinase régulée par signal extracellulaire
<b>ETTs</b>	Acides epoxy-eicosatrienoique
<b>F1+2</b>	Fragments 1 + 2 de la prothrombine
<b>FII</b>	Prothrombine
<b>FIIa</b>	Thrombine
<b>fa/fa</b>	Rat Zucker obèse
<b>FA/-</b>	Rat Zucker non obèse
<b>FEVG</b>	Fraction d'éjection du ventricule gauche
<b>FT</b>	Facteur tissulaire
<b>GCs</b>	Guanylate cyclase soluble
<b>Gla</b>	Acide- $\gamma$ -carboxyglutaminase
<b>Glu</b>	Acide glutamique
<b>GMPc</b>	Guanosine mono-phosphate cyclique
<b>Gp</b>	Glycoprotéine
<b>GTP</b>	Guanosine tri-phosphate

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Sulfure d'hydrogène
<b>HACT</b>	Hormone adrénocorticotrope
<b>HAEC</b>	cellules endothéliales aortiques humaines
<b>HDL</b>	Lipoprotéine de haute densité
<b>HRE</b>	Elément de réponse aux hormones
<b>HSD1</b>	11β-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1
<b>HSD2</b>	11β-hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 2
<b>Hsp</b>	Protéine de choc thermique
<b>IC</b>	Insuffisance cardiaque
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IL-1Ra</b>	Antagoniste du récepteur de l'IL-1
<b>ICAM-1</b>	Molécule 1 d'adhérence intercellulaire
<b>iNOS</b>	NOS inductible
<b>IP3</b>	Inositol triphosphate
<b>IP</b>	Récepteur aux prostacyclines
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	Récepteur de l'IP <sub>3</sub>
<b>JAK2</b>	Kinase janus 2
<b>JNK</b>	Kinase C-Jun N-terminal
<b>K</b>	Domaine « kringles»
<b>LDL</b>	Lipoprotéine de faible densité
<b>MCAM</b>	Molécule d'adhérence aux cellules de mélanome
<b>MCP-1</b>	Protéine chémoattractante 1 des monocytes
<b>MEC</b>	matrice extracellulaire
<b>MEGJ</b>	Pores myoendothéliaux
<b>MLCK</b>	Kinase de chaîne de myosine de bas poids moléculaire
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase matricielle
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>nNOS</b>	NOS neurale
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>NOS</b>	NO synthase
<b>PAD</b>	Pression artérielle diastolique
<b>PAI-1</b>	Inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène
<b>PAI3</b>	Inhibiteur de protéase 3
<b>PAM</b>	Pression artérielle moyenne
<b>PAR-1</b>	Récepteur 1 activé par les protéases
<b>PAS</b>	Pression artérielle systolique
<b>Pc</b>	Phosphatidyl choline sérine et éthanolamine
<b>PC</b>	Protéine C
<b>PCa</b>	Protéine C activée
<b>PCI</b>	Inhibiteur de la PC
<b>PDP</b>	Plasma dépourvu en plaquettes
<b>Pe</b>	Phosphatidyl éthanolamine
<b>PG</b>	Prostaglandine
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostacycline
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Phospholipase A2

<b>PIP2</b>	Phosphatidylinostol 4,5 bis-phosphate
<b>PKG</b>	Protéine kinase G
<b>PP</b>	Pression pulsée
<b>PRP</b>	Plasma riche en plaquettes
<b>Ps</b>	Phosphatidyl sérine
<b>PS</b>	Protéine S
<b>RAA</b>	Renine angiotensine aldostérone
<b>Rac</b>	Protéine G de la famille des Rho GTPase
<b>RG</b>	Récepteur glucocorticoïde
<b>RhoA</b>	Homologue A des gènes de la famille Ras
<b>RIAM</b>	Molécule d'interaction de Rap-1
<b>RM</b>	Récepteur minéralocorticoïde
<b>ROS</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>SAA</b>	Sérum amyloïde A
<b>SHR</b>	Rat spontanément hypertendu
<b>SMet</b>	Syndrome métabolique
<b>SO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de soufre
<b>SRC-1</b>	Coactivateur des récepteurs stéroïdes
<b>STIM1</b>	Molécule d'interaction stromale
<b>Src</b>	Tyrosine kinase proto-oncogène src
<b>TBX</b>	Thromboxane synthase
<b>TFPI</b>	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
<b>TM</b>	Thrombomoduline
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$
<b>TP</b>	Récepteur aux thromboxanes
<b>t-PA</b>	Activateur du plasminogène
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Thromboxane A <sub>2</sub>
<b>uPA</b>	Urokinase
<b>uPAR</b>	Récepteur à l'urokinase
<b>VCAM-1</b>	Molécule 1 d'adhérence vasculaire
<b>VE-cad</b>	Cadhérine vasculaire endothéliale
<b>VOP</b>	Vitesse d'onde de pouls
<b>vWF</b>	Facteur von Willebrand
<b>VD</b>	volumes diastolique
<b>VGCC</b>	Canaux Ca <sup>2+</sup> dépendants
<b>VS</b>	volumes systolique

## **I. CONTEXTE DU SUJET**

L'hémostase est un système de défense contre le saignement ; la thrombose est la conséquence de son fonctionnement aberrant dans le temps et dans l'espace. La thrombose consiste en la formation d'un caillot obturant un vaisseau sanguin. Le caillot, ou thrombus, est le produit final de l'hémostase primaire (l'agrégation plaquettaire) et de la cascade de la coagulation. Il peut se développer dans différents territoires vasculaires : dans les veines il conduit à la thrombose veineuse ; dans les artères, il peut provoquer une ischémie ou un infarctus. Les facteurs favorisant la formation d'un thrombus sont la lésion endothéliale, la stase sanguine et un déséquilibre de la balance hémostatique (triade de Virchow). Le risque thrombotique correspond à la probabilité qu'un thrombus se forme dans la circulation sanguine.

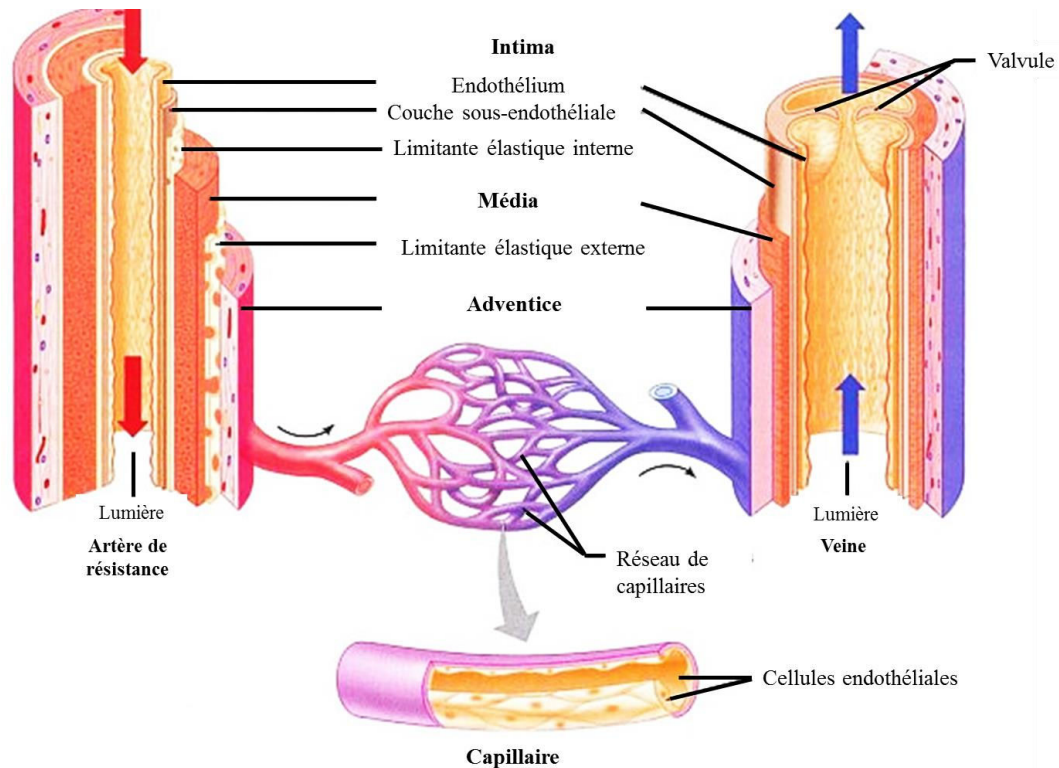
Le risque thrombotique est associé aux facteurs classiques de risque cardiovasculaire qui sont l'âge, l'hypertension, les diabètes de type 1 et 2, les dyslipidémies, le tabac, l'obésité, le sexe, ou encore des facteurs génétiques<sup>1</sup>. Ces facteurs de risque, notamment l'hypertension et le vieillissement entraînent des remaniements de la paroi artérielle et un état hypercoagulable, c'est-à-dire une augmentation des capacités du sang à coaguler qui prédispose un individu aux thromboses.

Le contexte général du travail est d'étudier les liens entre les modifications des propriétés artérielles et la cascade de coagulation dans des contextes favorisant l'insuffisance cardiaque (IC) et son aggravation. Nous avons utilisé le rat Zucker comme modèle de syndrome métabolique qui combine des anomalies du sang et des parois vasculaires, ainsi que le rat spontanément hypertendu (SHR) qui est naturellement hypertendu, ces deux pathologies favorisant le développement de l'IC. Nous avons également étudié des souris traitées à l'aldostérone ainsi qu'un modèle de souris surexprimant le récepteur minéralocorticoïde dans l'endothélium pour explorer l'interaction du système rénine/angiotensine/aldostérone, avec l'hémostase. Au plan clinique une cohorte de patients insuffisants cardiaques traités avec un antagoniste du récepteur à l'aldostérone augmente leurs chances de survie.

## II. POSITION DU SUJET

### II.1. Les vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins permettent les échanges de gaz et de nutriments entre l'environnement extérieur et les organes internes. Trois couches concentriques constituent les gros vaisseaux sanguins. L'intima, directement en contact avec le sang est constituée de cellules endothéliales (CE). La média, faite de cellules musculaires lisses (CML) et de matrice extracellulaire, et l'adventice, couche la plus externe constituée de fibroblastes et de fibres de collagène ou d'élastine. Au niveau des plus gros vaisseaux deux lames élastiques peuvent également être présentes pour séparer l'intima de la média, et la média de l'adventice, ce sont les limitantes élastiques interne et externe<sup>2</sup> (**Figure 1**).



**Figure 1 :** Structure de la paroi artérielle. Trois couches concentriques constituent les gros vaisseaux sanguins. L'intima directement en contact avec le sang constituée de cellules endothéliales, la média faite de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire et l'adventice, couche la plus externe constituée de fibroblastes et de fibres de collagène ou d'élastine. La taille de ces couches varie en fonction de la localisation du vaisseau, certaines couches pouvant disparaître, c'est le cas de l'adventice au niveau des plus petits vaisseaux.



## Les artères

Les artères sont classées en fonction de leur taille, qui est également le reflet de leurs fonctions et de leur structure (**Figure 2**). Les artères transportent le sang éjecté des ventricules cardiaques jusqu'aux organes. Le sang est propulsé du cœur à haute pression et de manière pulsatile, et, il perfuse les organes à une pression moyenne constante. Ces fonctions de transport et d'amortissement sont assurées par deux types de vaisseaux.

### Les artères élastiques

Ces artères (aorte, artères carotides, sous-clavières et iliaques communes), dites de gros calibre (supérieures à 2 mm de diamètre), ont pour rôle de mettre en place un écoulement sanguin continu à la place de l'écoulement pulsatile existant à la sortie du cœur. Ces artères, riches en fibres d'élastine et compliantes, sont capables d'emmagasiner près de 50 % du volume issu de la systole pour le restituer lors de la diastole et ainsi amortir la pulsativité.

### Les artères de résistances et artérioles

Les artères de résistances (de 2 mm à 150  $\mu\text{m}$  de diamètre) font suite aux artères élastiques, beaucoup moins déformables, et acheminent le sang vers les artérioles (de 8  $\mu\text{m}$  à 150  $\mu\text{m}$  de diamètre) qui finiront d'atténuer la pulsativité sanguine pour apporter aux capillaires un flux continu.

### Les capillaires

Les capillaires regroupent tous les vaisseaux faisant moins de 8  $\mu\text{m}$  de diamètre. C'est au niveau de ces vaisseaux que se font les échanges gazeux et en nutriments.

	Artères élastiques	Artères de résistance	Artérioles	Capillaires
Diamètre	> 2 mm	150 $\mu\text{m}$ –2 mm	8–150 $\mu\text{m}$	< 8 $\mu\text{m}$
Endothélium	+	++	+++	++++
Média	++	++	+	0
Fonction	Conduction, compliance	Compliance, résistance	Résistance,	échanges

**Figure 2 :** Structures et fonctions des différents types d'artères composant l'arbre vasculaire (d'après Safar et Lacolley., 2007)<sup>3</sup>.

### Les veinules et les veines

Le sang appauvri en dioxygène est pris en charge par les veinules et acheminé vers le cœur par les veines. Les veines n'ont pas la même forme que les artères ni la même capacité à rester

circulaires de par l'absence des limitantes élastiques interne et externe. Les veines possèdent également un système de valves, constitué de tissu conjonctif dense et formé pas un repli de l'intima destiné à empêcher le reflux sanguin.

## **II.2. Les cellules de la paroi vasculaire**

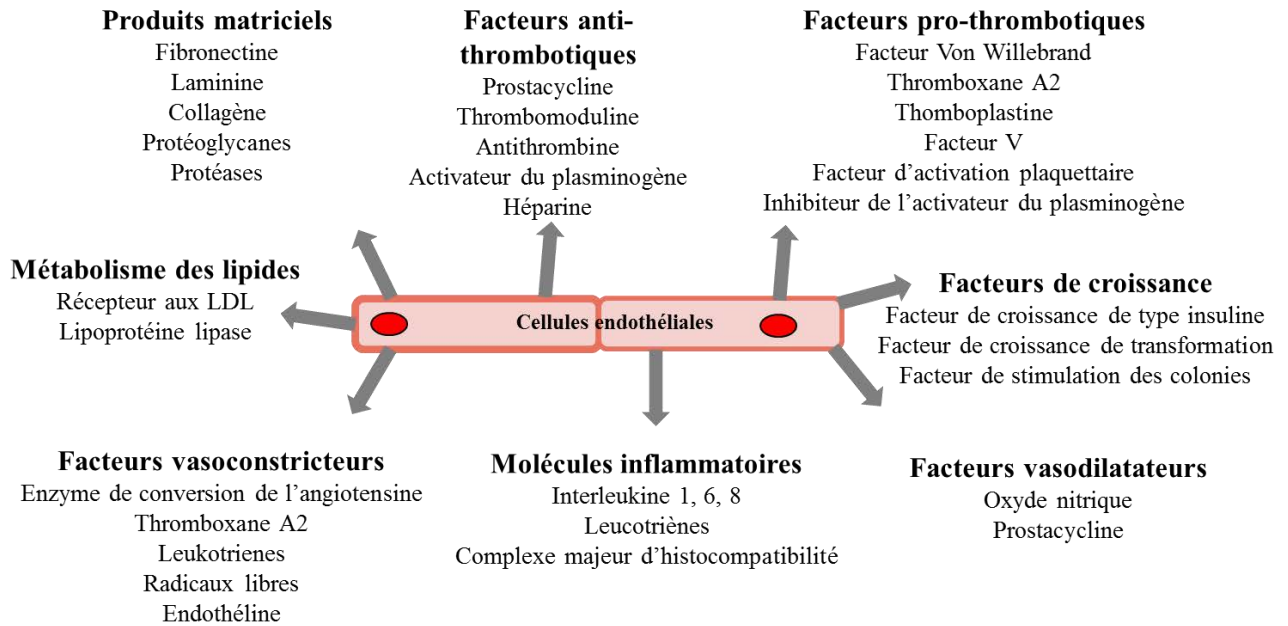
La paroi vasculaire remplit de nombreux rôles physiologiques allant de la régulation de la pression sanguine en passant par les échanges gazeux sans oublier le contrôle de l'hémostase. Ce tissu est constitué de plusieurs types cellulaires remplissant chacun des fonctions différentes.

### **II.2.1. Les cellules musculaires lisses (CML)**

La couche intermédiaire des parois vasculaires, la média, est constituée de CML. Ces cellules, contrairement aux cellules des muscles striés, sont uninuclées et leur contraction est régulée par le système nerveux autonome. Elles sont responsables de la régulation du diamètre des vaisseaux. Une vasoconstriction excessive au niveau péripériqué est responsable d'une hypertension tandis qu'une trop forte vasodilatation provoquera une hypotension. Le maintien d'une tension physiologique passe par une régulation impliquant les récepteurs adrénergiques et le système rénine angiotensine aldostérone (RAA). L'activation des récepteurs  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  adrénergique provoque une vasoconstriction, tandis que l'activation des récepteurs  $\beta_2$  aboutit à une vasodilatation.

### **II.2.2. Les cellules endothéliales (CE)**

Ces cellules ont un rôle fondamental dans un large panel de processus physiologiques tel que la régulation du tonus vasculaire, la coagulation, ou encore l'immunité (**Figure 3**). Les CE sont issues du mésoderme, tout comme les autres cellules hématopoïétiques et représentent 1,5 % de la masse corporelle<sup>4</sup>.



**Figure 3 :** Actions des (cellules endothéliales) CE. Les CE ont à la fois des fonctions métaboliques et de synthèse et agissent via un large panel de molécules sur de nombreux types cellulaires. LDL : lipoprotéine de faible densité (d'après Galley et Webster., 2004)<sup>4</sup>.

En dépit de leur origine commune, ces cellules présentent des phénotypes très variables dépendant de leur localisation dans l'arbre vasculaire. Ainsi cette monocouche de cellules peut être continue dans les gros vaisseaux et fenêtrée dans la microcirculation. Les CE sont aplaties, faisant 0,3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur dans les capillaires et jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  dans certains gros vaisseaux. Elles sont allongées dans le sens du flux sanguin<sup>5,6</sup> et possèdent une durée de vie très longue (plusieurs années)<sup>7</sup> en dépit des stress qu'elles subissent. Ces cellules sont également polarisées, leur partie apicale, en contact avec le sang, a des propriétés anticoagulantes (ou thromborésistantes) en séparant le sang de la partie thrombogène sous-jacente. Les CE sont directement ancrées dans les éléments thrombogènes de la paroi, éléments qu'elles sont capables de synthétiser tels que le collagène ou des métalloprotéinases matricielles (MMP), d'où l'importance de la polarisation, les éléments anticoagulants devant être dirigés vers le pôle apical et les éléments procoagulants constituant la lame basale vers le pôle basal.

### II.2.3. Les marqueurs et l'évaluation de l'état de l'endothélium

L'état de l'endothélium et sa dégradation vont influencer des processus allant de l'immunité à l'hémostase. Un mauvais fonctionnement peut se traduire par la sécrétion anarchique de différentes molécules (angiopoïétine-2, CD146, facteur von Willebrand (vWF)), cet état est appelé activation endothéliale. L'atteinte globale des fonctions des CE est appelée dysfonction endothéliale<sup>8</sup>. La dysfonction endothéliale est un état pathologique caractérisé par un déséquilibre entre les substances vasodilatatrices, antimitotiques et antithrombotiques et les substances vasoconstrictrices, prothrombotiques et à fonction proliférative<sup>9</sup>.

Il existe plusieurs marqueurs plasmatiques de la fonction endothéliale.

Le dosage de molécules d'adhérence circulantes est souvent utilisé pour explorer l'état de l'endothélium. Le CD146 ou MCAM (molécule d'adhérence aux cellules de mélanome) est une molécule d'adhérence de 113 kDa codée par le gène MCAM, localisé au niveau des jonctions endothéliales. Le CD146 soluble (sCD146) renseigne sur l'état des jonctions endothéliales<sup>10</sup>. ICAM-1 (molécule 1 d'adhérence intercellulaire) est principalement synthétisée par les CE mais également par les cellules immunitaires. C'est une protéine transmembranaire à un seul domaine transmembranaire<sup>11</sup>. ICAM permet la liaison à l'intégrine LFA-1 (antigène 1 associé aux fonctions lymphocytaires), présente à la surface des leucocytes. L'expression d'ICAM est très augmentée au niveau des CE et des cellules du système immunitaire (macrophages, lymphocytes) lorsque ces cellules sont stimulées par des cytokines proinflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou l'interleukine (IL) 1 et elle acquiert une activité proinflammatoire une fois liée à une intégrine<sup>12</sup>. VCAM-1 (molécule 1 d'adhérence vasculaire) est exclusivement synthétisée par les CE, plusieurs isoformes existent chez l'homme. Tout comme ICAM-1 son expression augmente après stimulation par des cytokines, elle permet également l'adhérence de lymphocytes au vaisseau<sup>13</sup>. Le fait de retrouver une augmentation dans le plasma de ces molécules témoigne de la présence d'une altération de l'endothélium.

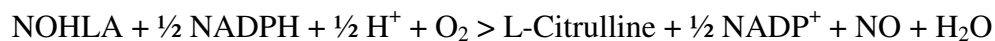
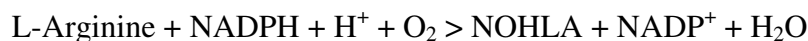
Dans le cas d'un diabète de type 2 le taux de la phospholipase A<sub>2</sub> associée aux lipoprotéines de faible densité (PLA<sub>2</sub>-LDL) est corrélé à la gravité de la dysfonction endothéliale. La PLA<sub>2</sub>-LDL

est une phospholipase calcium-indépendante dont la fonction est d'hydrolyser et d'inactiver les facteurs d'activation plaquettaire et les phospholipides issus des LDL oxydés<sup>14,15</sup>.

Plusieurs facteurs de la coagulation sont également utilisés et peuvent rendre compte de l'état de l'endothélium. C'est notamment le cas du vWF, de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), de la thrombomoduline (TM), de l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1) et de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA).

#### II.2.4. La régulation de la vaso-réactivité par l'endothélium

Le contrôle de la réactivité vasculaire est principalement réalisé par les CE. Ce rôle de l'endothélium a été observé pour la première fois en 1980 par Robert Furchgott qui mit en évidence une relaxation de l'aorte chez le lapin en réponse à l'acétylcholine via l'endothélium<sup>16</sup>. Les CML de la média ont leur tonus modulé par les facteurs libérés par les CE (**Figure 4**). Dans des conditions physiologiques la balance entre facteurs de relaxation et facteurs de contraction tend vers une prédominance des facteurs de relaxation, le principal, découvert en 1987, étant le monoxyde d'azote (NO)<sup>17</sup>. La synthèse du NO est réalisée dans les CE à partir d'arginine. La NO synthase (NOS) catalyse l'oxydation de l'arginine en oxyde nitrique et en citrulline via son domaine oxygénase en deux réactions de mono oxygénation<sup>18</sup> :



La NOS existe sous 3 isoformes, une forme endothéliale (eNOS), une forme inductible (iNOS) et une forme neuronale (nNOS)<sup>19</sup>. Ces trois formes, qui sont ubiquitaires, sont exprimées au niveau des CE, des CML et des cellules myocardiques, des plaquettes, des macrophages, des lymphocytes, des neurones et sont codées par des gènes situés sur différents chromosomes. Le gène de la forme endothéliale se situe sur le chromosome 7 et la protéine qui en résulte est membranaire<sup>20,21</sup>.

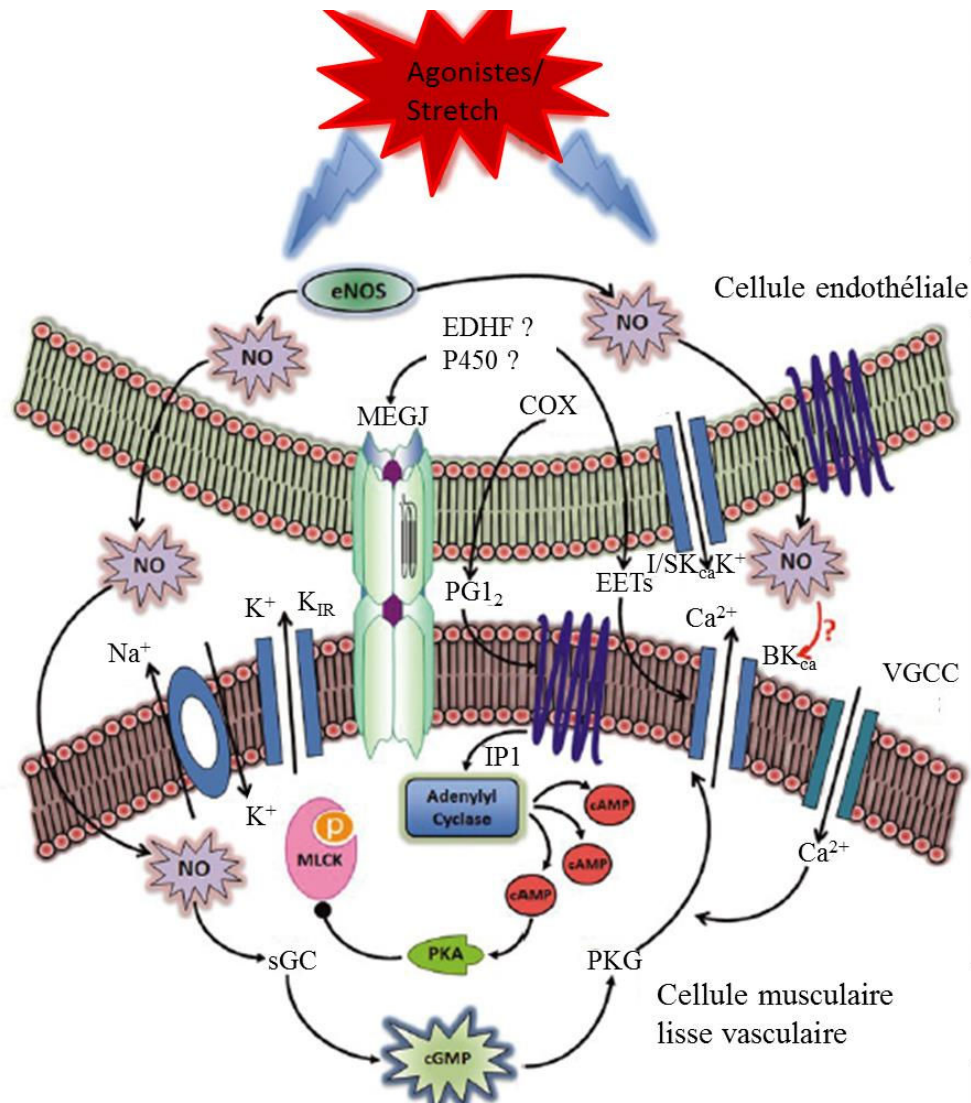
La majorité du NO synthétisé au niveau pariétal l'est par les CE<sup>22</sup>. Le NO étant très labile, il diffuse vers les CML où il joue son rôle de vasodilatateur. Il active la guanylate cyclase soluble (sGC) ce qui provoque une augmentation de la guanosine mono-phosphate cyclique (GMPc)

produite à partir de guanosine tri-phosphate (GTP)<sup>23</sup>. La finalité de cette cascade est l'ouverture des canaux potassiques qui vont permettre l'hyperpolarisation et la relaxation de la CML.

L'intervention d'un facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF) qui serait responsable de l'hyperpolarisation des CML en provoquant l'ouverture des canaux potassiques est également évoquée<sup>24</sup>.

D'autres facteurs relaxants et contractants produits par l'endothélium peuvent également intervenir. La relaxation des CML peut intervenir par l'intermédiaire de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), produite à partir d'acide arachidonique (AA) par l'enzyme cyclo-oxygénase (COX) au niveau des CE. La PGI<sub>2</sub> provoque une augmentation d'AMPc (adénosine mono-phosphate cyclique) au niveau des CML qui va aboutir à leur relaxation. Bien que les effets de la PGI<sub>2</sub> soient moindres que ceux du NO, les deux mécanismes sont interdépendants. En effet, la PGI<sub>2</sub> potentialise la libération de NO, ce dernier permettant d'augmenter en retour son action en inhibant la phosphodiesterase au niveau des CML.

D'autres composés comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le monoxyde de carbone (CO), le sulfure d'hydrogène et le dioxyde de soufre (H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub>), des produits de dégradation du cytochrome P450 (CYP) comme les acides epoxy-eicosatriénoïques, ont un effet sur les CE en augmentant les concentrations extracellulaires de K<sup>+</sup> provoquant l'activation des canaux calciques potassium-dépendants<sup>25</sup>.



**Figure 4 :** Interactions entre les CE, les CML. Le relargage de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et l'influx de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire au niveau des CE initient :

- la vasodilatation endothélium-dépendante aboutissant à la génération de NO (monoxyde d'azote) par l'eNOS (NO synthase endothéliale).
- la synthèse de prostacycline (PGI<sub>2</sub>) par la cyclooxygénase (COX).
- l'activation de l'EDHF (facteur endothélial hyperpolarisant).

L'activation NO dépendante de la guanylate cyclase (sGC) produit de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP) et de la protéine kinase G (PKG). L'ouverture des canaux BKCa (BK), l'hyperpolarisation, et la fermeture des canaux Ca<sup>2+</sup> dépendants (VGCC) par la cGMP et PKG permettent la relaxation des CML. De plus l'activation du récepteur IP<sub>1</sub> des CML par PGI<sub>2</sub> permet l'augmentation d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) aboutissant également à la relaxation par inhibition de la kinase des chaînes de myosine de bas poids moléculaire (MLCK). L'hyperpolarisation des CML se fait par :

- l'EDHF via les pores myoendothéliaux (MEGJ)

- la formation de CYP (cytochrome P450), tout comme d'acide epoxy-eicosatrienoique (ETTs) (par leur action sur les canaux BK) et/ou d'efflux de K<sup>+</sup> par ouverture des canaux SK, SKCa, KCa2.3
- les conductances induites (IK ou IKCa, KCa3.1) par les canaux potassium-dépendants. Le tissu adipeux périvasculaire pourrait également moduler les interactions CE-CML par la sécrétion de molécules telles que des adipokines ou encore la génération de superoxyde (d'après Triggle et coll., 2012)<sup>25</sup>. CE : cellules endothéliales ; CML : cellules musculaires lisses.

### **II.2.5. L'implication des CML dans l'hémostase**

La fonction la plus connue des CML est la vasomotricité qui conditionne l'irrigation sanguine des organes. Sa régulation est assurée par le système nerveux autonome ainsi que par la production intrinsèque de NO par les CE<sup>26</sup>.

L'athérosclérose qui allie inflammation, cellules du système immunitaire (macrophage, neutrophiles, lymphocyte) et conduit à une déstabilisation de la paroi vasculaire pouvant mener à une rupture de la plaque d'athérome et provoquer des thromboses. Le système de l'hémostase est de plus en plus fortement lié à la mise en place et au développement de la plaque d'athérome.

En cas de brèche vasculaire, les CML exercent un effet de vasoconstriction et l'exposition du collagène présent au niveau du sous-endothélium favorise l'activation et l'agrégation plaquettaire pour aboutir à des thrombi plaquettaires et fibrino-cruoriques plus stables. De surcroît, les CML se trouvent alors au contact de sang et pourraient être directement impliquées dans l'hémostase. La synthèse de molécules procoagulantes par les CML suggère également que ces cellules pourraient de façon autonome générer de la thrombine au niveau pariétal. Cette thrombine est susceptible d'exercer des effets cellulaires ou des effets coagulants au sein de la paroi.

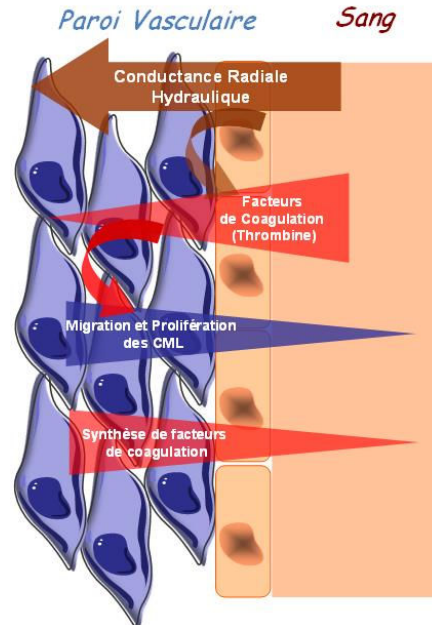
La molécule centrale de la coagulation sanguine, la thrombine, a aussi des effets sur plusieurs fonctions biologiques des cellules constituant la paroi vasculaire, comme la prolifération, la différenciation, la migration des CML ou des CE, la réponse inflammatoire, la production de la matrice extracellulaire (MEC), le développement vasculaire, l'athérogénèse et l'angiogénèse. Vu et coll ont découvert le premier récepteur de la thrombine, appartenant à la famille des récepteurs PARs, récepteur 1 activé par les protéases (PAR-1)<sup>27</sup>. La thrombine, via ce récepteur, module la vasoconstriction ou la vasodilatation de la paroi vasculaire en fonction des agonistes libérés par l'activation des CML. En pathologie, 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 PAR-1, -2 et -4, présents à la surface des CML, sont responsables des effets de la thrombine sur la migration<sup>28</sup>, la prolifération et l'hypertrophie<sup>29</sup>. En réponse à des contraintes mécaniques (20% de déformation), il existe une augmentation de l'expression de PAR-1 dans les CML, qui participe à la prolifération cellulaire induite par la thrombine. Les voies de signalisation induites par l'activation des PAR impliquent les MAP kinases : Kinase régulée par signal extracellulaire (ERK), Kinase C-Jun N-terminal (JNK) et p38<sup>30-32</sup>. La thrombine joue également un rôle critique dans les processus d'inflammation. La thrombine peut induire l'expression de facteurs inflammatoires tels que l'interleukine-6 (IL-6) ou augmenter la sécrétion des MMP qui dégradent la MEC et accélèrent le remodelage vasculaire<sup>33-35</sup>.

Ainsi, la thrombine régule de très nombreuses fonctions au niveau de ces cellules telles que la différenciation, la migration, l'inflammation, la synthèse d'ADN et l'expression de certains gènes<sup>36-40</sup>. Une des caractéristiques majeures de la thrombine est le côté pléiotropique de ses effets, à la fois dans le compartiment sanguin et dans le compartiment pariétal. Les déterminants de la génération de thrombine par les cellules vasculaires ainsi que les quantités générées ne sont pas connus et jouent probablement un rôle majeur dans les effets thrombotiques et cellulaires de la thrombine.

En raison de la conductance radiale hydraulique, la paroi artérielle est constamment soumise à la convection de molécules circulantes plasmatiques<sup>41</sup>. Par ce processus, les facteurs de coagulation pourraient se retrouver en contact direct avec les CML en absence de brèche vasculaire. Cette convection physiologique des peptides ou des macromolécules du plasma vers la paroi est la principale source de stimuli extrinsèques, qui, avec le temps, modifie le phénotype des CML (surcharge lipidique, hyperglycémie ou influence de zymogènes tels que les facteurs de coagulation) (**Figure 5**). En réponse à des changements de ces forces de convection liés à différentes situations physiologiques comme le vieillissement ou pathologiques comme l'hypertension, l'athérosclérose ou les anévrismes de l'aorte, les CML peuvent modifier leur phénotype par des voies de signalisation ligand / récepteur.



**Figure 5 :** Transfert bidirectionnel des facteurs de coagulations entre la paroi artérielle et le sang.

### **II.3. L'hémostase**

Lors d'une brèche vasculaire l'hémostase est le système physiologique qui permet de stopper le saignement. Elle commence par la formation d'un clou plaquettaire, et est suivie de la cascade de coagulation qui aboutit à la formation d'un caillot de fibrine au niveau de la brèche. Ce processus est très finement régulé afin d'éviter la formation de caillots qui obstrueraient totalement le vaisseau lésé. La coagulation est déclenchée par le biais de molécules exposées avec le sang lorsque la barrière formée par l'endothélium est rompue et que la couche sous-endothéliale se retrouve en contact avec le sang.

### **II.3.1. La fonction plaquettaire**

Les plaquettes, ou thrombocytes, sont des fragments anucléés issus des mégacaryocytes. Ces cellules contiennent des filaments d'actine, des microtubules, des grains de glycogène, des mitochondries, des granules alpha, des granules denses et des lysosomes. La numération plaquettaire normale chez l'homme est de 150 à 400 giga/l, 1/3 des plaquettes totales étant stockées dans la rate.

Leur durée de vie varie entre 7 et 12 jours, elles sont éliminées par phagocytose au niveau de la rate, du foie, et de la moelle osseuse par les monocytes et macrophages.

#### **II.3.1.1. L'activation plaquettaire en réponse à une brèche vasculaire**

L'endothélium sain n'interagit pas avec les plaquettes. Ses propriétés anti-thrombotiques sont dues à la composition et à l'arrangement des phospholipides et des glycoprotéines de la membrane qui ne permettent pas l'interaction avec les plaquettes. La CE est polarisée de manière à présenter une face apicale anticoagulante (ou thromborésistante) tandis que la face basale, elle, adhère fortement aux molécules thrombogènes du sous-endothélium.

Ce n'est qu'en cas de brèche, ou d'altération de l'endothélium que les plaquettes vont réagir avec les éléments thrombogènes du sous-endothélium (collagène, vWF, FT) aboutissant à l'activation des plaquettes. Ce processus comprend plusieurs étapes qui sont le changement de forme, l'agrégation, la sécrétion et la microvésiculation conduisant à l'expression à leur surface des phospholipides procoagulants<sup>42,43</sup>.

#### **II.3.1.2. L'Adhérence et le changement de forme**

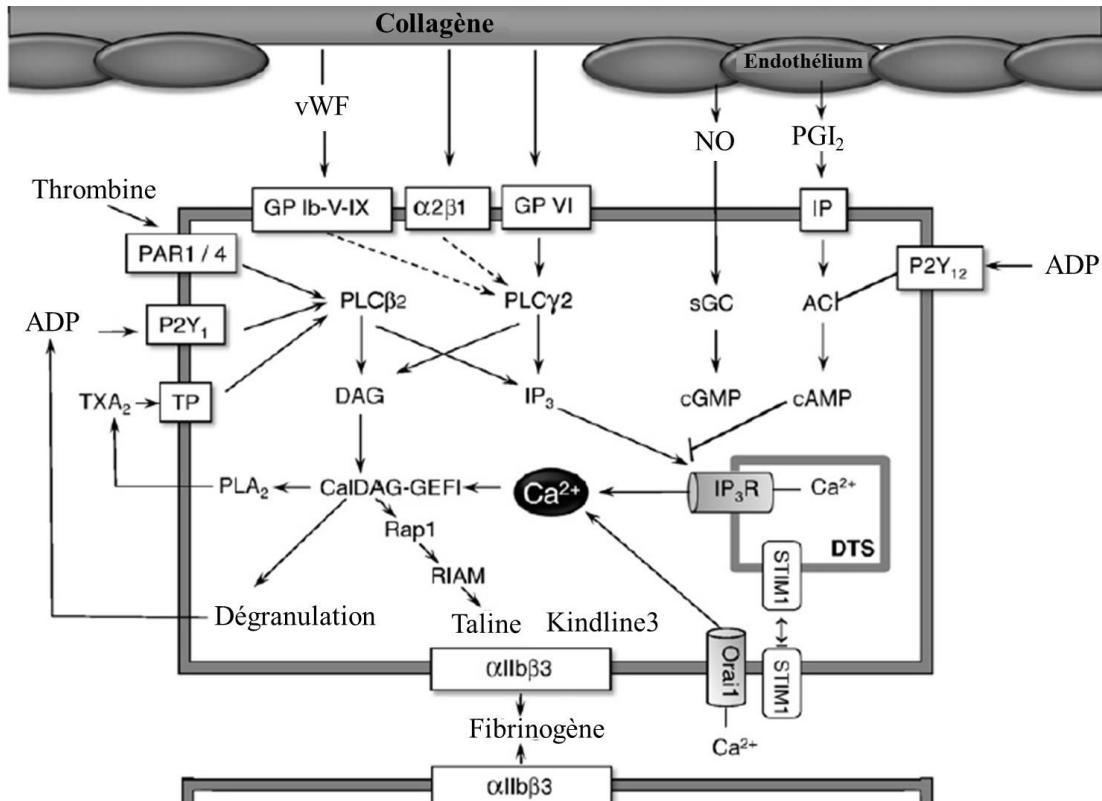
De nombreuses molécules interviennent dans l'adhérence des plaquettes au sous-endothélium tels que le vWF ou encore la glycoprotéine (Gp) Ib formant un complexe avec les glycoprotéines IX et V (**Figure 6**).

Le vWF, synthétisé par les CE et les mégacaryocytes, peut être soit secrété de manière constitutive, soit stocké dans les corps de Weibel Palade jusqu'à sa sécrétion par un stimulus<sup>44</sup>. Au niveau des plaquettes, le vWF est stocké dans les granules  $\alpha$  d'où il sera secrété suite à l'activation des plaquettes<sup>45</sup>. La forme plasmatique du vWF ne permet pas son adhérence aux plaquettes si ces dernières ne sont pas activées<sup>46</sup>. S'il y a une brèche vasculaire, le vWF peut se fixer au collagène contenu dans le sous-endothélium ce qui provoque un changement conformationnel du vWF lui permettant d'interagir avec le complexe GpIb-V-IX formé à la surface des plaquettes<sup>47,48</sup>.

Quatre glycoprotéines forment le complexe GpIb-IX-V. Il possède des domaines riches en leucine et est contenu dans la membrane plaquettaire. GpIb $\alpha$  et GpIb $\beta$  sont liées par un pont disulfure et associées de façon non covalente avec GpIX et GpV<sup>49</sup>.

La fixation du vWF au complexe GpIb-V-IX aboutit à une élévation du calcium cytoplasmique, un réarrangement du cytosquelette entraînant la dégranulation :

Le complexe vWF/GpIb-V-IX provoque l'activation de la phospholipase C $\gamma$ 2 qui va générer deux messagers, l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) par hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 bis-phosphate (PIP2). L'IP3 formé mobilise le calcium cytoplasmique et le DAG active la PKC et induit le réarrangement du cytosquelette d'actine. La finalité est l'activation de la GpIIbIIIa qui pourra lier le fibrinogène suite à une modification conformationnelle<sup>43</sup>.



**Figure 6 :** Les différentes voies d'activation plaquettaire. Les plaquettes peuvent adhérer au sous-endothélium par l'intermédiaire de différentes molécules (vWF, fibronectine, thrombospondine). Les récepteurs d'adhérence GP Ib-IX-V pour le vWF, PAR1 et 4 pour la thrombine, P2Y<sub>1</sub> pour l'ADP vont induire une forte augmentation cytoplasmique de Ca<sup>2+</sup>. Il est libéré du système tubulaire dense (DST) via le canal formé par le récepteur inositol 1,4,5-triphosphates (IP<sub>3</sub>R). Les voies mettent en jeu les phospholipase C β<sub>2</sub> (PLCβ<sub>2</sub>) et γ<sub>2</sub>, et la formation d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et de diacylglycérol (DAG). Le Ca<sup>2+</sup> peut également être importé de l'environnement extracellulaire par le canal calcique activable moiety (Orai1), canal activé par interaction avec la molécule d'interaction stromale 1 (STIM1) qui peut être transloqué du DST à la membrane cellulaire lorsque la concentration en Ca<sup>2+</sup> du DST diminue<sup>50,51</sup>. Cette augmentation de Ca<sup>2+</sup> et de DAG va moduler le facteur d'échange I de la guanine (CalDAG-GEFI) (et aboutir à la dégranulation plaquettaire). Il va ensuite activer Rap 1b (une protéine de liaison du GTP) cette dernière régulant le réarrangement du cytosquelette en agissant sur la molécule d'interaction de Rap-1 (RIAM). Rap-1 et RIAM vont former un complexe avec la Taline qui va activer l'α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> et permettre l'agrégation plaquettaire par l'intermédiaire du fibrinogène<sup>52-54</sup>.

La réaction pourra également être amplifiée par l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) et la génération de thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) qui active la PLCβ<sub>2</sub> par l'intermédiaire du récepteur aux thromboxane (TP). D'autres molécules sécrétées peuvent également participer à cette amplification (ADP, vWF, thrombospondine...)

La fonction anti-agrégante de l'endothélium est quant à elle assurée par le NO, la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) via le récepteur aux prostacyclines (IP), qui vont tous deux permettre d'inhiber l'IP<sub>3</sub>R par génération de GMPc et d'AMPc. L'ADP, quant à lui, lorsqu'il agit sur son récepteur P2Y<sub>12</sub> inhibe l'adénylate cyclase et la génération d'AMPc (d'après Broos et coll., 2011)<sup>43</sup>.

Au repos les plaquettes sont discoïdes (maintenues par les réseaux de microtubules et de filaments d'actine situés sous la membrane plaquettaire). L'activation provoque la dépolymérisation des microtubules, tandis que les filaments d'actine, eux, polymérisent. Ces phénomènes aboutissent à un changement de forme de la plaquette qui devient sphérique et émet des pseudopodes.

Quand la plaquette est activée, les membranes des granules fusionnent avec celle du système canaliculaire ouvert. Les molécules thrombogènes sécrétées telles que l'ADP, la sérotonine, la thrombospondine, le fibrinogène et le vWF vont participer au recrutement de plaquettes non activées et initier l'agrégation<sup>55</sup>.

### **II.3.1.3. L'agrégation plaquettaire**

Le complexe calcium dépendant GpIIbIIIa ou  $\alpha_{IIb}\beta_3$  joue un rôle central dans l'agrégation plaquettaire. Il fait partie de la famille des intégrines se liant à des séquences RDG (Arginine-Glycine-Asparagine). Ces séquences sont présentes au niveau de protéines telles que le fibrinogène, le vWF, la prothrombine, la fibronectine ou encore la vitronectine.

Le complexe GpIIbIIIa est un hétérodimère constitué de deux glycoprotéines : IIb et IIIa. La GpIIb est composée d'une chaîne lourde extracellulaire ( $\alpha$ ) et d'une chaîne légère transmembranaire ( $\beta$ ) reliées entre elles par un pont disulfure. La GpIIIa est, quant à elle, constituée d'une chaîne polypeptidique unique, comportant plusieurs ponts disulfures.

Chaque plaquette compte environ 50 000 complexes GpIIbIIIa à sa surface et ce nombre augmente avec l'activation plaquettaire et la libération du contenu des granules  $\alpha$ . Le complexe est activé suite à une protéolyse de la partie extracellulaire de la sous-unité IIb. Cette activation, qui provoque un changement de forme, permet au complexe de lier des protéines adhésives telles que le fibrinogène, le vWF, ou la vitronectine.

La liaison entre les plaquettes va se faire par l'intermédiaire du fibrinogène. Le fibrinogène possède 3 paires de sites de liaison pour la GpIIbIIIa. Il établit ainsi des ponts entre deux

GpIIbIIIa d'une même plaquette ou de deux plaquettes différentes. Les complexes ainsi formés vont être stabilisés par la thrombospondine qui va se fixer sur la GpIIIb et le fibrinogène<sup>56-59</sup>. Le vWF se fixe aussi à la GpIIbIIIa, cela provoque un étalement des plaquettes, leur adhérence irréversible et participe à étendre l'agrégation en établissant des ponts avec les GpIIbIIIa de plaquettes voisines (**Figure 7**).

#### **II.3.1.4. La sécrétion**

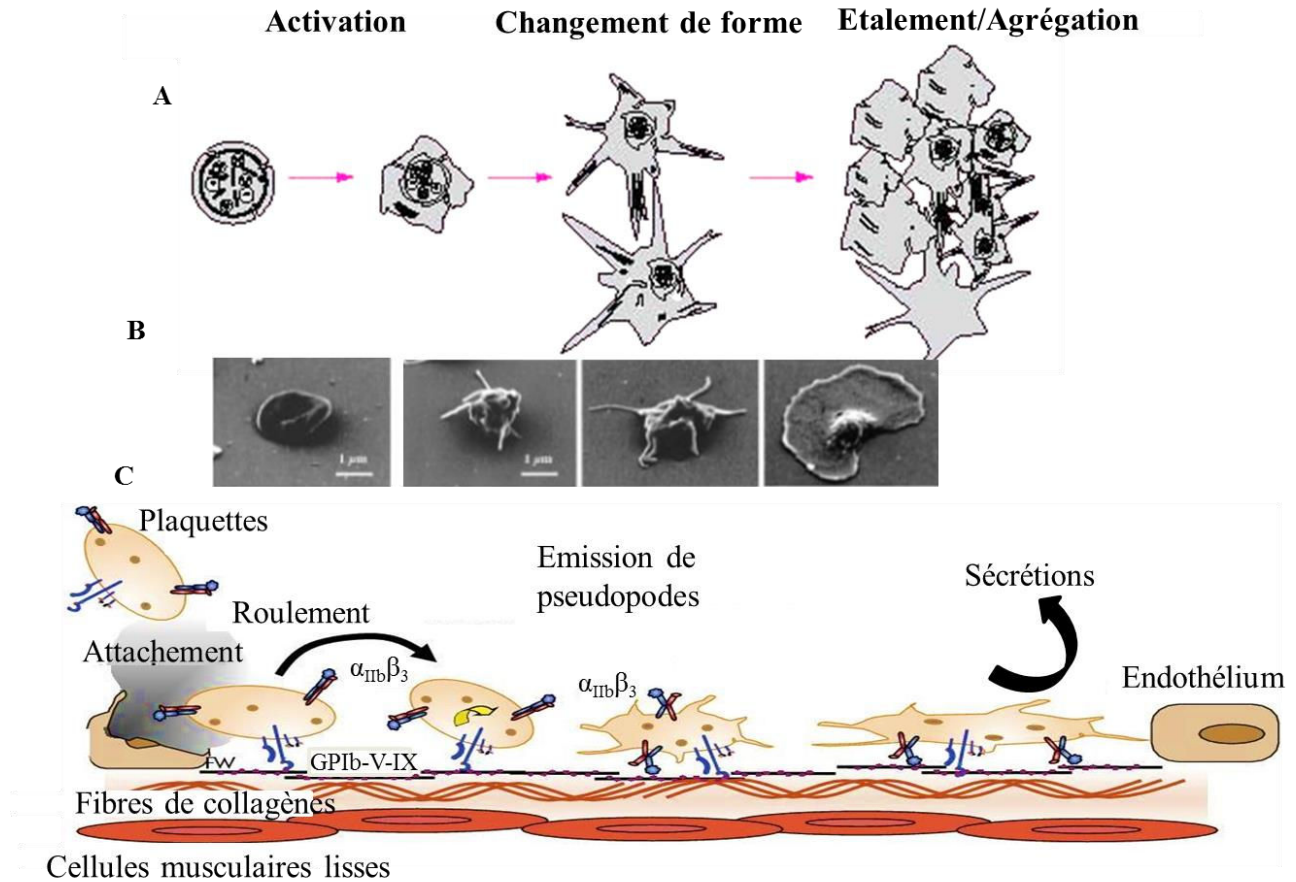
La sécrétion des trois types de granules peut avoir lieu selon deux mécanismes différents faisant suite à l'adhérence et à la contraction des plaquettes. Les molécules libérées peuvent renforcer l'agrégation et la sécrétion des plaquettes (ADP, calcium, fibrinogène et sérotonine), intervenir dans la cascade de coagulation (FV, fibrinogène, vWF, PS) et modifier la perméabilité vasculaire (VEGF) et le tonus vasculaire (sérotonine).

La sécrétion impliquant la voie de l'AA est observée dès la présence de faibles concentrations d'agoniste.

Au moins deux voies permettent de générer de l'AA à partir des phospholipides membranaires : 1) à partir du phosphatidylinositol par action de la phospholipase C (PLC) et de la diglycérade lipase ou 2) à partir de la phosphatidylcholine ou de la phosphatidyléthanolamine par action de la phospholipase A2. La cyclooxygénase va transformer une partie de l'AA libéré en prostaglandine endoperoxydes (PG) G2 et H2. La PGH2 sous l'effet de la thromboxane synthase (TBX) génère du TBXA2, ce dernier inhibe la production d'AMPc intraplaquettaire et la libération de calcium. Le TBXA2 est vasoconstricteur et inducteur de l'agrégation plaquettaire.

Si les concentrations en agonistes sont élevées la sécrétion plaquettaire est déclenchée par un mécanisme indépendant de la voie de l'AA. Cette voie fait intervenir des protéines G couplées aux récepteurs des agonistes, la protéine Gp qui active la PLC et la protéine Gi qui inhibe l'activité de l'adénylate cyclase et diminue le taux d'AMPc. Deux messagers sont générés par

l'activation de la PLC et l'hydrolyse du PIP2 : l'IP3 et le DAG. L'IP3 produit mobilise le calcium cytoplasmique et le DAG active la PKC ce qui favorise la sécrétion et l'agrégation<sup>43,55</sup>.



**Figure 7 :** Les différentes étapes de l'activation plaquettaire. A et C ; schémas des différentes phases de l'agrégation plaquettaire. B : photographie des étapes de la fixation des plaquettes à une surface de fibrinogène. Suite à la stimulation par un agoniste, les plaquettes vont changer de forme, acquérir la capacité de se fixer aux composants du sous endothélium à l'aide des complexes formés par les glycoprotéines Ib-V-IX ou  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , émettre des pseudopodes par réarrangement du cytosquelette, et exprimer à leur surface des phospholipides procoagulants en même temps que d'émettre des micro-vésicules (particules procoagulantes). Les plaquettes totalement activées et étalées vont alors recruter/activer d'autres plaquettes pour former le clou plaquettaire.

(A : d'après Nurden et coll., 2002<sup>60</sup>)

(B : d'après Kuwahara et coll., 2002<sup>61</sup>)

(C : d'après Lanza et coll., 2008<sup>62</sup>)



### **II.3.1.5. La microvésiculation**

La dernière étape de l'activation plaquettaire correspond à l'expression à la face externe des membranes plaquettaires de phospholipides anioniques procoagulants (Phosphatidylsérine majoritairement) encore appelée « flip-flop » membranaire. Une libération de microvésicules riches en phospholipides anioniques dans la circulation sanguine a également lieu. Ces microvésicules, exprimant à leur surface des phospholipides procoagulants peuvent être impliquées dans la coagulation. Leur rôle dans les pathologies est depuis quelques années mis en avant<sup>63,64</sup>.

### **II.3.2. Le système de la coagulation**

La coagulation sanguine permet la formation d'un caillot en cas de brèche vasculaire. La coagulation nécessite les facteurs de la coagulation (facteurs pro- et anti-coagulants), des surfaces phospholipidiques ainsi que la présence de calcium.

L'étape majeure de la coagulation est la génération de thrombine, elle précède la formation du caillot de fibrine<sup>65</sup>.

#### **II.3.2.1. Les protéines de la coagulation**

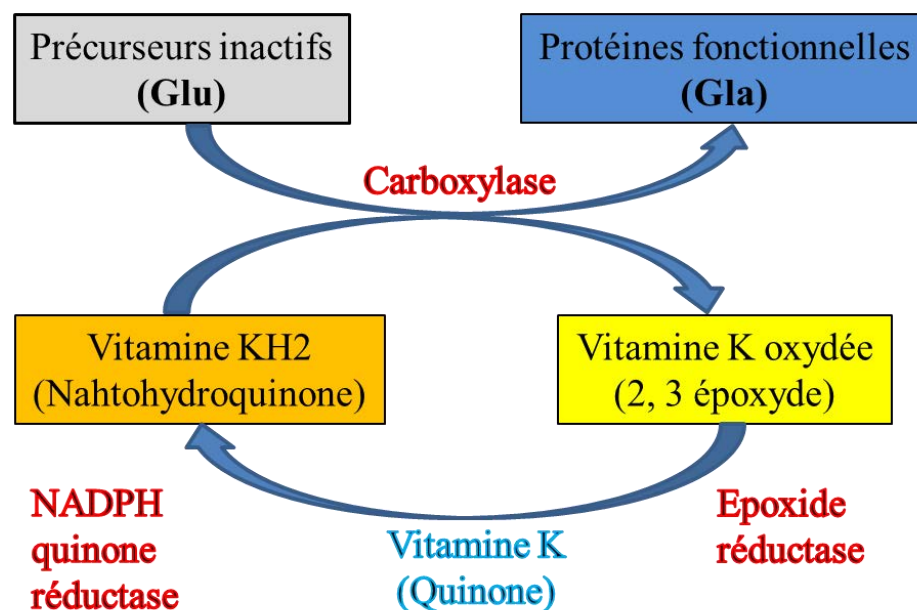
Les protéines de la coagulation sont composées de facteurs pro-coagulants et de facteurs anti-coagulants qui inhibent la coagulation. A l'exception du facteur tissulaire (FT) tous les facteurs (F) de la coagulation sont des glycoprotéines dont le lieu de synthèse principale est le foie (**Tableau 1**). La nomenclature de ces facteurs a été standardisée en 1954, chacun porte un chiffre romain, chiffre qui est suivi d'un « a » pour désigner les facteurs activés<sup>66</sup>.

Les facteurs de la coagulation sont de trois types, les zymogènes, les cofacteurs et les inhibiteurs.  
> Les zymogènes sont les facteurs présentant une forme inactive et dont une protéolyse limitée et spécifique provoque leur activation. Suite à cette protéolyse, les facteurs acquièrent une activité enzymatique. Les facteurs II, VII, IX, XI et XII (ainsi que la prékallikréine) sont des zymogènes de type sérine protéase possédant un site catalytique masqué jusqu'à leur activation. Ce site est

	<b>Fonction</b>	<b>PM (Da)</b>	<b>Concentration plasmatique (µg/mL)</b>	<b>Lieu de synthèse</b>
<b>Fibrinogène</b>	Substrat	333000	200 à 400	Foie
<b>Prothrombine</b>	Zymogène	72000	100	Foie
<b>Facteur V</b>	Procofacteur	330000	10	Foie
<b>Facteur VII</b>	Zymogène	51000	0.5	Foie
<b>Facteur VIII</b>	Procofacteur	330000	0.1	Foie
<b>Facteur IX</b>	Zymogène	55000	5	Foie
<b>Facteur X</b>	Zymogène	59000	10	Foie
<b>Facteur XI</b>	Zymogène	160000	5	Foie
<b>Facteur XII</b>	Zymogène	80000	30	Foie
<b>Facteur XIII</b>	Zymogène	300000	20	Foie
<b>Facteur tissulaire</b>	Cofacteur	37000	0	CE, CML, fibroblaste, CE, macrophages...
<b>Protéine C</b>	Zymogène	62000	5	Foie
<b>Protéine S</b>	Cofacteur	80000	25	Foie
<b>Thrombomoduline</b>	Cofacteur	60300	0	CE et CML
<b>Antithrombine</b>	Inhibiteur	58200	150	Foie
<b>Récepteur endothélial de la protéine C</b>	Inhibiteur	46000	100	CE, CML
<b>Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire</b>	Inhibiteur	42000	5 à 20	CE, CML, hépatocytes
<b>Facteur Von Willebrand</b>	Cofacteur	270000	10	CE, mégacaryocytes

**Tableau 1 :** Les protéines de la coagulation. CE : cellules endothéliales ; CML : cellules musculaires lisses ; PM : poids moléculaire.

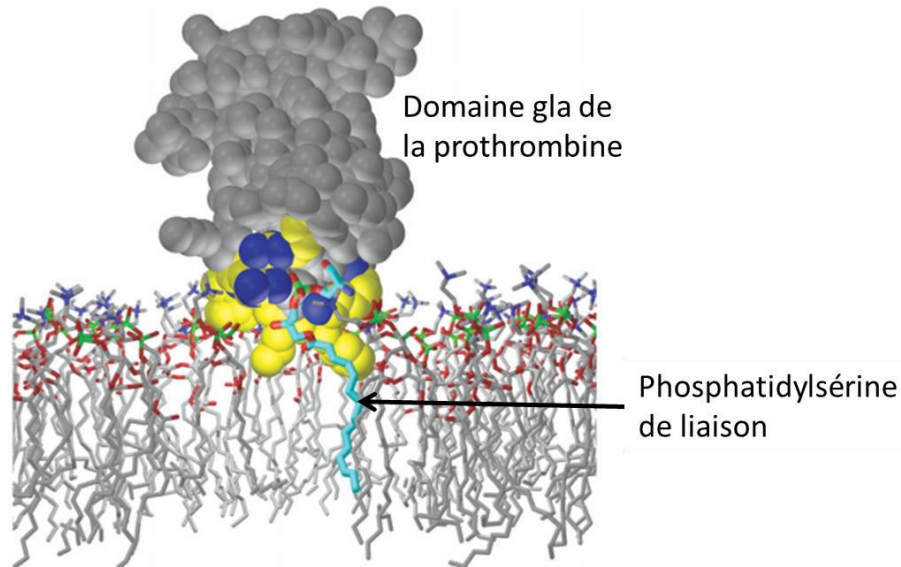
situé au niveau de la partie C-terminale. Certains facteurs sont vitamine K-dépendants. La vitamine K est le cofacteur de l'enzyme carboxylase qui convertit des résidus d'acide glutamique en acide- $\gamma$ -carboxyglutamique (Gla) dans la région amino-terminale des facteurs II, VII, IX, X et des protéines S et C (PS et PC) (**Figure 8**). La présence de résidus Gla est nécessaire pour la liaison des protéines aux phospholipides anioniques. Ces résidus forment des liaisons de haute affinité avec les ions calcium qui vont provoquer un changement de forme du domaine créant l'exposition de zones hydrophobes et ainsi permettre la fixation aux surfaces cellulaires<sup>67</sup>.



**Figure 8 :** Réaction de carboxylation des protéines vitamine-K dépendantes. La vitamine K permet, à l'aide d'une carboxylase, d'activer les précurseurs en protéines fonctionnelles en convertissant les acides glutamiques (Glu) en acide- $\gamma$ -carboxyglutamique (Gla). La vitamine K peut être régénérée par les enzymes époxyde réductase et NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) quinone réductase.

La prothrombine ou FII, codé chez l'homme par le gène F2, est le précurseur de la molécule clé de la cascade de coagulation : la thrombine (FIIa)<sup>68</sup>. Sa masse molaire est de 72 kDa (36 pour la thrombine) pour une chaîne polypeptidique de 579 acides aminés et est présente à une concentration circulante de 100  $\mu$ g/ml. La présence en partie N-terminale d'un domaine Gla

permet à la prothrombine, en présence de calcium, de fixer les phospholipides chargés négativement (**Figure 9**). La capacité de la prothrombine à fixer les phospholipides des surfaces cellulaires va dépendre de la quantité de phospholipide disponible<sup>69</sup>.



**Figure 9 :** Modélisation du complexe formé par les protéines vitamine K-dépendantes à la surface des phospholipides (exemple de la prothrombine) Le domaine 1 de la prothrombine, lié aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ , s'insère dans la zone interstitielle de la bicouche lipidique et lie une unique molécule de phosphatidylsérine. En jaune, la boucle terminale du domaine 1 de la prothrombine ; en noir, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  fixés à la chaîne protéique du domaine Gla ; en bleu les chaînes latérales des acides aminés (Lys 3, Arg 10 et Arg 16) qui vont fixer la phosphatidylsérine. Au niveau des phosphatidylsérines, en rouge l'oxygène, en bleu l'azote, en vert le phosphore (d'après Huang et coll., 2003)<sup>69</sup>.

Les facteurs VII, IX et X portent deux domaines EGF (facteur de croissance épithélial) qui permettent de former des complexes avec différentes protéines de la coagulation. Au niveau de la prothrombine ce sont deux domaines « kringles » (K1 et K2) qui assurent cette fonction. Les facteurs XI et XII (et la prékallikréine) portent également une région coté N-terminal qui leur donne la capacité de se lier à des surfaces phospholipidiques ainsi qu'à d'autres protéines de la coagulation (fixation au FXI pour le FXIIa, et fixation à la thrombine pour le FXIa)<sup>70</sup>.

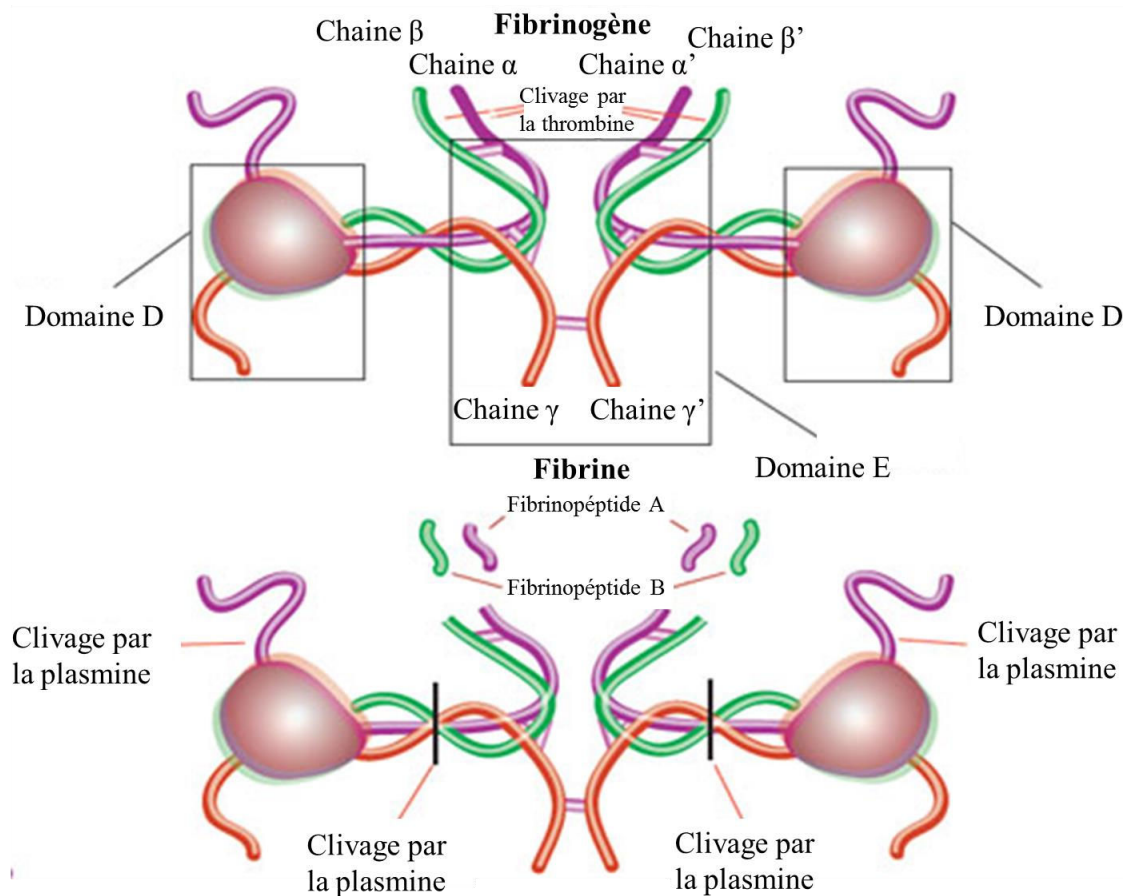
> Les cofacteurs sont au nombre de 3 : facteurs V et VIII et le FT. Ce sont des catalyseurs dont la fonction est d'augmenter la vitesse d'activation d'autres enzymes (**Tableau 2**). L'activité

catalytique du FT existe sans nécessité d'activation préalable. Les facteurs V et VIII acquièrent leur activité catalytique après activation par la thrombine<sup>65</sup>.

Facteur de la coagulation	Complexe d'activation	Zymogène	$K_{cat}/K_M$ $\mu M^{-1}, min^{-1}$	Facteur d'activation
Facteur VIIa	Facteur VIIa/FT/PcPs/CaCl <sub>2</sub>	Facteur IX	5560	
	Facteur VIIa/FT/PcPs/CaCl <sub>2</sub>	Facteur X	885	1,8.10 <sup>7</sup>
Facteur IXa	Facteurs IXa/VIIa/PcPs/CaCl <sub>2</sub>	Facteur X	7937	1,2.10 <sup>9</sup>
Facteur Xa	Facteurs Xa/Va/PcPs/CaCl <sub>2</sub>	Prothrombine	5019	1,1.10 <sup>6</sup>

**Tableau 2 :** Augmentation de l'activation des zymogènes en présence de composés formant les complexes d'activation. Le rapport entre la constante de Michaelis ( $K_m$ ) et la constante catalytique ( $K_{cat}$ ) donne l'efficacité du complexe enzymatique, et le facteur d'activation est donné par rapport à l'activation du zymogène seul. PcPs : phosphatidylcholine, phosphatidylsérine ; TF : facteur tissulaire (d'après Butenas et Mann., 2002)<sup>65</sup>.

Le fibrinogène est une molécule de 340 kDa synthétisée par les hépatocytes, circulant dans le sang à une concentration de 200 à 450 mg/dl et représentant environ 3% des protéines plasmatiques. C'est une protéine dimérique composée de 3 paires de chaînes ( $\alpha$ , 63,5 kDa ;  $\beta$ , 56 kDa ; et  $\gamma$ , 47 kDa) liées de façon covalente par des ponts disulfures situés aux extrémités N-terminales des chaînes polypeptidiques (**Figure 10**). Deux domaines forment la protéine, le domaine E qui contient un pont disulfure et permet de lier les deux sous unités, et le domaine D qui contient un domaine globulaire. Il contient les fibrinopeptides A et B coté N-terminal des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement qui vont être libérés suite au clivage par la thrombine. C'est suite à ce clivage que le fibrinogène va polymériser et la fibrine va être formée pour aboutir à la constitution d'un caillot insoluble. Le fibrinogène pourra également permettre la liaison entre les plaquettes (décrit dans la partie **II.3.1.2**).



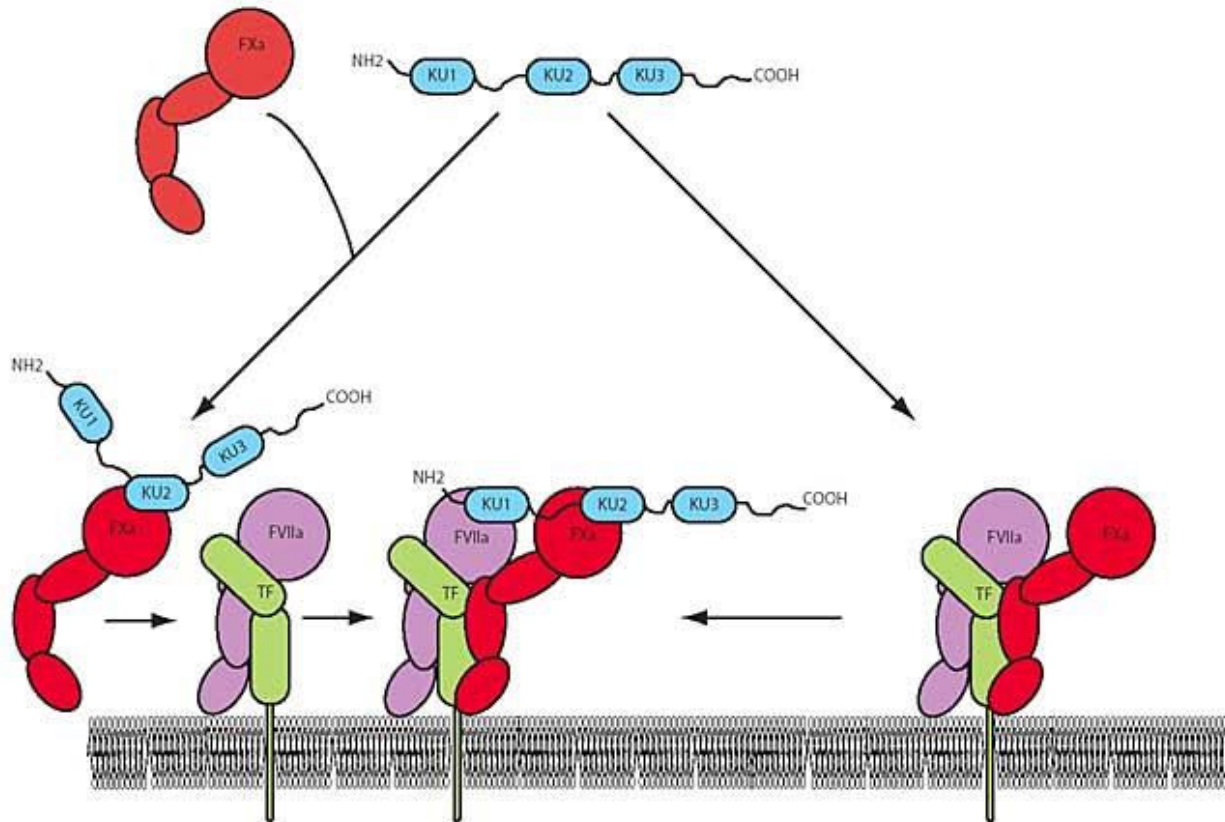
**Figure 10 :** Structure du fibrinogène et de la fibrine. Le fibrinogène est un dimère formé de trois chaînes peptidiques ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) composé de deux domaines (D et E). La fibrine est produite suite à protéolyse par la thrombine des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  et formation de fibrinopeptides A et B. La fibrine sera ensuite clivée par la plasmine à différents endroits (décrit dans la partie **II.3.3**) (d'après Putnam., 1975)<sup>71</sup>.

Il existe deux systèmes qui permettent de limiter la coagulation au niveau d'une brèche vasculaire, ce sont les inhibiteurs circulants, dits stœchiométriques, directement actifs dans le plasma et le système de la protéine C (PC) qui lui est dynamique et devient actif en réponse à une activation par la thrombine. Le rôle de la paroi vasculaire, et notamment des CE, dans la régulation de l'inhibition de la coagulation est majeur.

**Les principaux inhibiteurs stœchiométriques sont :**

- l'antithrombine (AT), une protéine de 432 acides aminés produite par le foie, inhibe principalement la thrombine et le FXa, mais elle a la capacité d'inhiber tous les facteurs de la coagulation qui ont été activés. Il existe deux formes d'AT, une forme majoritaire, l' $\alpha$ -AT, et une forme minoritaire la  $\beta$ -AT. La différence entre les deux formes résulte en l'absence de l'un des sites de glycosylation chez la  $\beta$ -AT ; ils sont au nombre de 4 chez l' $\alpha$ -AT. De plus la  $\beta$ -AT a une plus grande affinité pour l'héparine que l' $\alpha$ -AT. Ainsi la vitesse d'inhibition de la thrombine par l'AT peut être jusqu'à 2300 fois lorsque la  $\beta$ -AT est fixée à de l'héparine ou un héparane sulfate<sup>72</sup>. Le FXa quant à lui peut avoir son inhibition augmentée jusqu'à 1 million de fois si des concentrations physiologiques en calcium sont ajoutées au milieu réactionnel<sup>73</sup>.

- le TFPI, synthétisé principalement par les CE (mais également par le foie ou encore les CML) inhibe le FXa, contrairement à l'AT, de manière réversible. C'est un inhibiteur lent, compétitif qui forme des liaisons faibles. Une fois un complexe formé avec le FXa le TFPI aura la capacité d'inhiber le complexe formé par le TF et le FVIIa et donc d'inhiber le déclenchement de la cascade de coagulation (**Figure 11**). La coagulation ne pourra être déclenchée que si les complexes atteignent une certaine concentration TF/FVII<sup>74,75</sup>.



**Figure 11 :** Inhibition du facteur tissulaire, des FVIIa et FXa par le TFPI (inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, FT). Le TFPI, ici représenté en bleu, peut inhiber directement le complexe TF/FVIIa/FXa, ou se fixer au FXa avant que ce dernier ne lie le complexe FT/FVIIa (d'après Gomez et McVey., 2006)<sup>76</sup>.

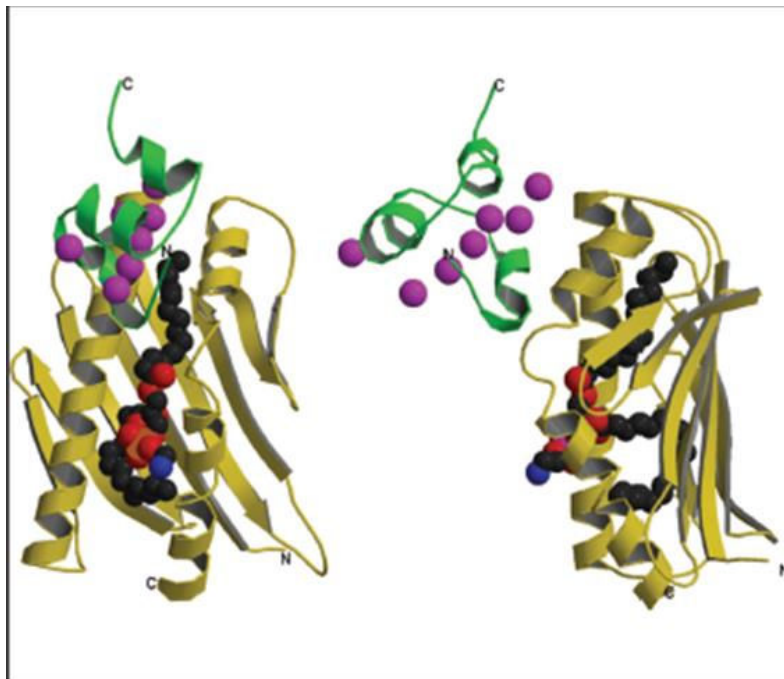
- Le système dynamique de la PC dépend de plusieurs facteurs et récepteurs : la PC, un récepteur (le récepteur endothélial à la PC, l'EPCR), un catalyseur de l'activation par la thrombine (la TM), un cofacteur (la PS), et un activateur : la thrombine<sup>72,77,78</sup>.

La PC est une glycoprotéine de 62 kDa synthétisée par le foie, codée par le gène PROC porté par le chromosome 2, et présente dans le sang à une concentration de 5 µg/mL<sup>79</sup>. Elle est constituée de deux chaînes, une chaîne légère de 155 acides aminés et une lourde de 262 acides aminés liées par un pont disulfure Lys-Arg. Elle possède un domaine sérine protéase activé par le complexe thrombine/TM/EPCR suite à un changement conformationnel après clivage entre les résidus Arg 169-Leu 170<sup>80,81</sup>.

L'EPCR est une protéine membranaire de type I composée de 2 hélices  $\alpha$  et 8 feuillets  $\beta$  reliés entre eux et permettant de se fixer aux phospholipides (principalement phosphatidylcholine, mais

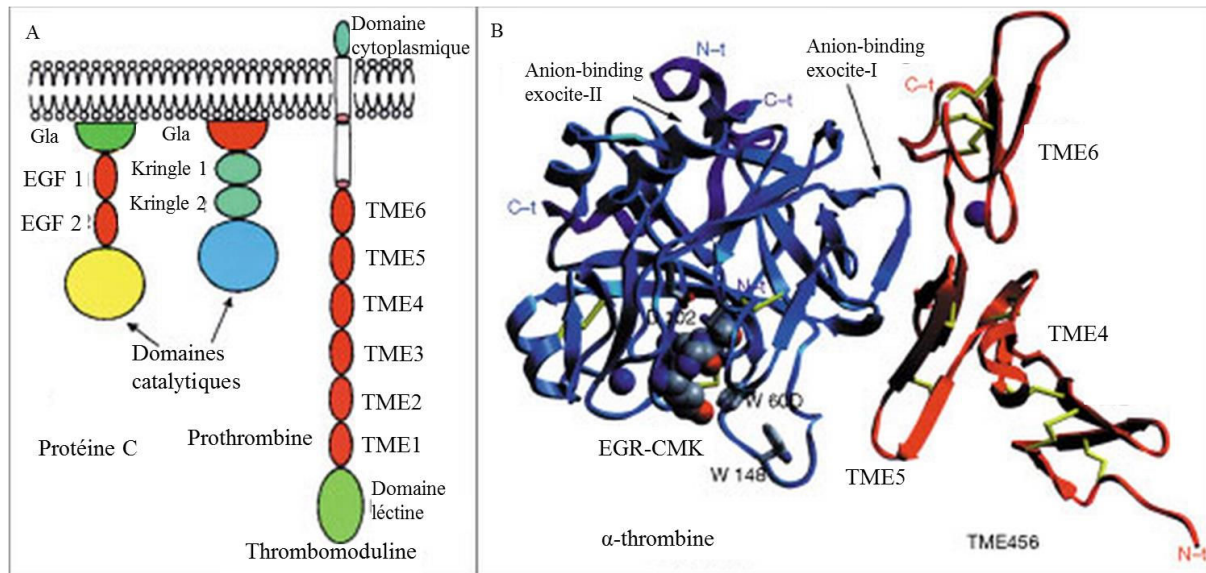


également phosphatidyléthanolamine) (**Figure 12**). Elle est codée, sur le chromosome 20, par le gène PROCRC, et synthétisée par les CE<sup>82</sup>. L'EPCR n'est pas seulement présent au niveau de l'endothélium, il peut être clivé par ADAM17 (une metallopeptidase aussi appelée TACE pour enzyme de conversion du TNF- $\alpha$ ) et se retrouver dans la circulation<sup>83</sup>. Cet EPCR circulant peut fixer la PC et la PC activée (PCa) mais inhibe l'activité anticoagulante de celle-ci, il aura donc un effet prothrombotique antagoniste de la forme membranaire<sup>84</sup>. La forme membranaire de l'EPCR augmente de 20 fois l'activation de la PC par le complexe thrombine/TM<sup>85</sup>. Les mutations de l'EPCR avec la présence de l'haplotype A3 sont liées à une augmentation des thromboses veineuses<sup>86</sup>. Chez la souris, l'inhibition de l'EPCR par un anticorps diminue de 88 % la conversion de PC en PCa suite à une injection de thrombine, augmentant de ce fait le risque de thrombose<sup>87</sup>. A l'inverse, des souris surexprimant au niveau endothélial l'EPCR seront protégées de la thrombose en permettant une augmentation de la conversion de PC en PCa<sup>88</sup>. L'haplotype A3 de l'EPCR est également corrélé à une augmentation de la quantité d'EPCR circulant<sup>89</sup>.



**Figure 12 :** Modélisation de la PC (protéine C) liée à l'EPCR (récepteur endothélial de la protéine C). Seul le domaine vitamine K de la PC est représenté (en violet et vert) et un phospholipide dans sa partie centrale (sphères noires, rouges, oranges et bleues) sont représentés (d'après Esmon., 2004)<sup>85</sup>.

La TM est une protéine transmembranaire de 68 kDa synthétisée par les CE et encodée par le gène THBD porté par le chromosome 20<sup>90</sup>. La forme sécrétable est détectée à deux poids moléculaires différents (75 kDa et 105 kDa)<sup>91</sup>. Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique de 557 acides aminés. Cette protéine a la capacité de fixer la thrombine par l'intermédiaire de ses domaines EGF 5 et 6 (elle en possède 6 au total) ce qui a pour effet de modifier ses propriétés enzymatiques tout en inactivant les fonctions pro-coagulantes de la thrombine (**Figure 13**). La thrombine couplée à la TM possède une vitesse d'activation de la PC en PCa augmentée d'un facteur 1000 par rapport à la thrombine seule<sup>74,75,92</sup>.



**Figure 13 :** Structure et interaction des molécules anticoagulantes **A** ; organisation de la PC (protéine C), de la prothrombine et de la TM (thrombomoduline). Ces protéines peuvent se fixer aux membranes phospholipidiques par l'intermédiaire de leur domaine Gla (acide- $\gamma$ -carboxyglutaminase). **B** ; modélisation du complexe formé entre l' $\alpha$ -thrombine (en bleu), les domaines 4, 5 et 6 de la thrombomoduline (en rouge), et l'inhibiteur L-Glu-Gly-Arg kétone chlorométhyle (ERG-CMK) qui reproduit le peptide activateur de la PC (sphères représentant les atomes colorés en gris, pour le carbone, en bleu pour l'azote et en rouge pour l'oxygène). Les ponts disulfures sont représentés en jaune et les ions portés par les chaînes protéiques en violet pour le Ca<sup>2+</sup> et en bleu pour le Na<sup>+</sup> (d'après Fuentes prior et coll., 2000)<sup>93</sup>.

La PS est une protéine plasmatique de 70 kDa constituée d'une chaîne de 635 acides aminés à présente une concentration de 25  $\mu$ g/ml. Dans le plasma 60 à 70 % de la PS sont liés à une protéine du complément, la protéine de liaison (C<sub>4</sub>BP) et seule la forme libre peut être le

cofacteur de la PCa<sup>94,95</sup>. Récemment, il a également été montré que le TFPI, par sa liaison à la PS pourrait être directement impliqué dans l'activation de la PC en PCa<sup>96</sup>.

L' $\alpha_2$ -macroglobuline, le second cofacteur de l'héparine, et l' $\alpha_1$ -antitrypsine, apparaissent être également des régulateurs de la coagulation. L' $\alpha_2$ -macroglobuline peut agir sur l'hémostase au niveau de la coagulation, en inhibant la thrombine, ou encore sur la fibrinolyse, en inhibant la plasmine et la kallikreine<sup>97</sup>. Le second cofacteur de l'héparine, un inhibiteur des sérines protéases, a la capacité d'inhiber rapidement la thrombine en présence d'héparine ou encore de dermatane sulfate (un glycosaminoglycane)<sup>98</sup>. En ce qui concerne l' $\alpha_1$ -antitrypsine c'est un inhibiteur des protéases de la famille des serpins dont l'expression peut être considérablement augmentée par des cytokines, et qui peut agir sur la thrombine, le FXIa, la kallikreine ou encore la plasmine<sup>99</sup>.

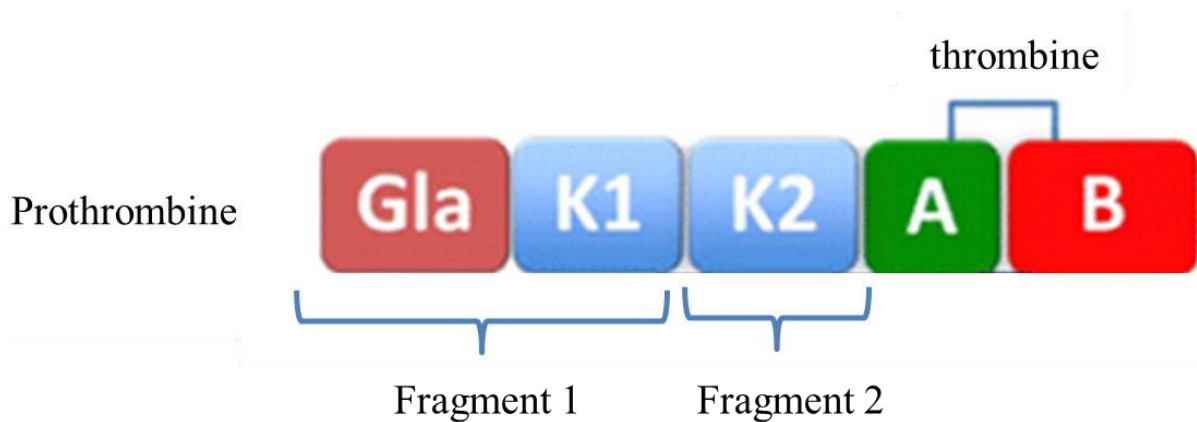
En plus de son action sur la coagulation la PCa est impliquée dans des réponses cytoprotectrices, notamment celles faisant suite à une ischémie. Dans des modèles animaux d'ischémie cérébrale, la PCa limite l'altération de la barrière hémato-encéphalique et des neurones et inhibe la réponse inflammatoire. Cet effet a lieu par activation du récepteur PAR-1 suite à la liaison de la PCa<sup>100</sup>. Le choc septique augmente le risque de thrombose par la dysfonction vasculaire et l'activation des plaquettes et des leucocytes qu'il provoque. Des protocoles cliniques étaient en cours jusqu'en 2012 pour administrer de la PCa à des patients atteints de choc septique ou de sepsis sévère. Cependant ces traitements n'ayant pas permis de montrer d'amélioration, et étant même liés à une augmentation du risque hémorragique, ils ont été abandonnés<sup>101</sup>.

### **II.3.2.2. Les différentes étapes de la coagulation**

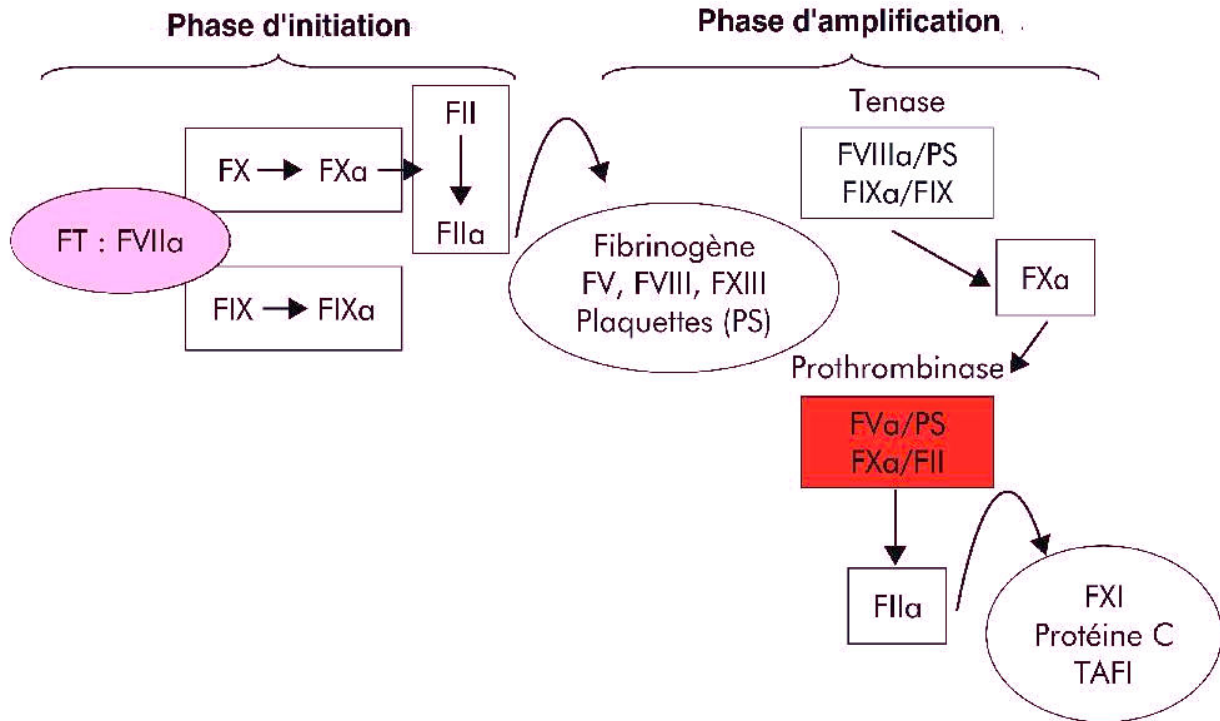
La cascade de coagulation est décomposée en trois phases ; l'initiation, l'amplification/propagation, et l'inhibition<sup>65,102</sup>. Cette cascade de réactions enzymatiques a lieu à la surface de cellules exposant des phospholipides chargés négativement (principalement la phosphatidylsérine) et aboutit à la polymérisation du fibrinogène circulant en fibrine insoluble.

**> Initiation :**

Les réactions commencent lorsque du FT se retrouve au contact du sang suite à la formation d'une brèche vasculaire, le FT étant en temps normal isolé du sang par l'endothélium puisqu'il est synthétisé de manière constitutive par les cellules de la paroi, CML ou encore fibroblastes. Des cellules circulantes, telles que les monocytes, ou de la parois vasculaire, telles que les CE, synthétisent elles aussi du FT mais de manière inductible en réponse à des cytokines proinflammatoire (TNF- $\alpha$ , IL-1, protéine C réactive)<sup>103,104</sup>. C'est l'interaction entre le FT et le FVIIa qui va déclencher la coagulation. Le FVIIa est présent de manière basale dans la circulation et représente 1 à 2 % du FVII total<sup>105</sup>. Son interaction avec le FT lui confère une activité protéolytique et ce complexe FT/FVIIa est susceptible d'être inhibé par le TFPI. Le complexe FT/FVIIa va activer les facteurs IX et X. Le FXa active la prothrombine à la surface des plaquettes activées ce qui provoque la formation de thrombine (**Figure 15**). Cette activation génère deux fragments (F1 et F2) ainsi qu'un fragment en N-terminal de la chaîne A (**Figure 14**)<sup>106</sup>.



**Figure 14 :** Structure de la prothrombine (d'après Chen et coll., 2010)<sup>107</sup>.



**Figure 15 :** Initiation et de amplification de la coagulation (d'après Sié et coll., 2003)<sup>108</sup>.

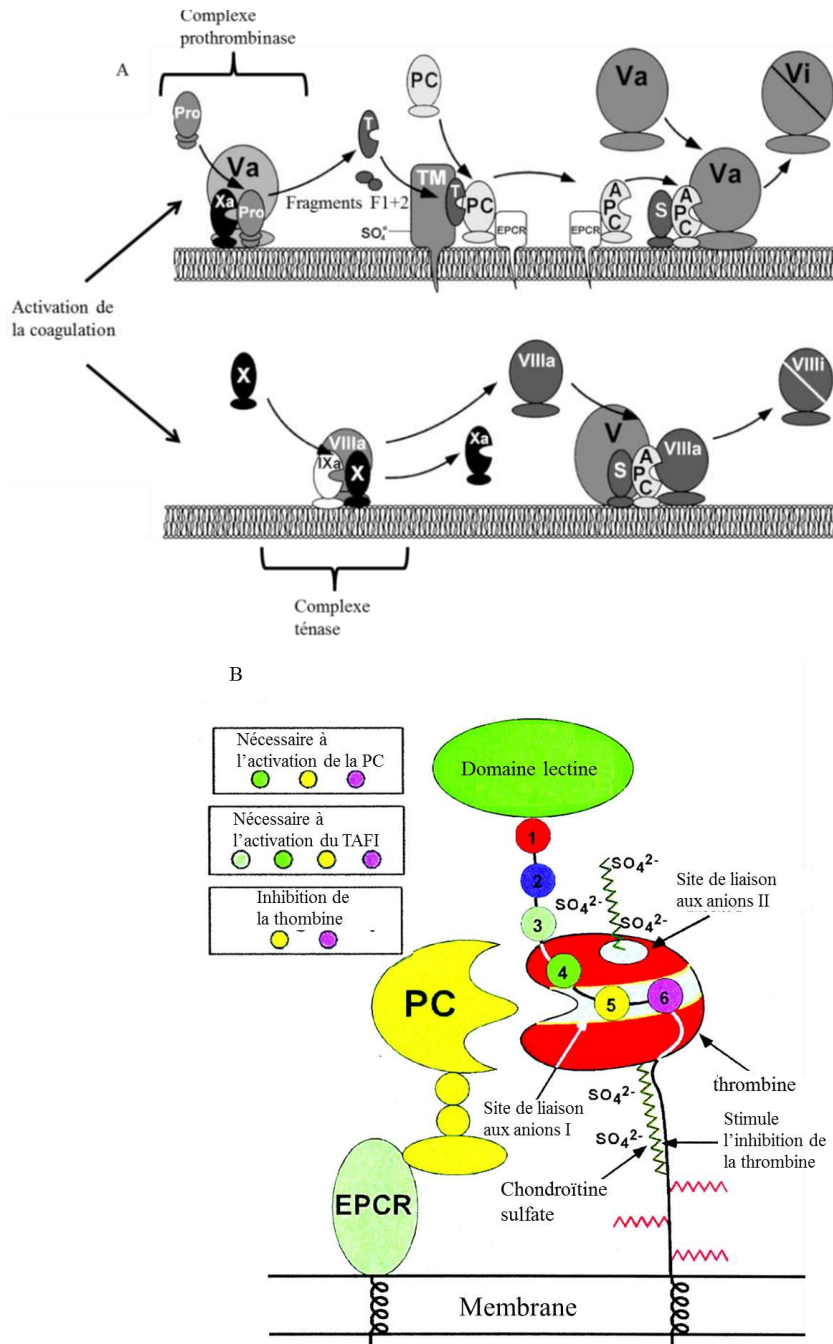
L'**amplification** et la **propagation** de la coagulation commencent au moment où les premières traces de thrombine sont formées au niveau de la brèche vasculaire. La thrombine formée active les plaquettes en se fixant aux récepteurs activés par PAR-1 et -4, augmentant ainsi les phospholipides membranaires disponibles pour la coagulation. L'externalisation des phospholipides anioniques est rendue possible par l'inhibition de la flippase et l'activation de la scramblase.<sup>109</sup>

La thrombine va également activer les facteurs VIII et V dont le rôle de cofacteur va engendrer la formation des complexes ténase (FIXa-FVIIIa-Ca<sup>2+</sup>-phospholipides<sup>-</sup>) et prothrombinase (FXa-FVa-Ca<sup>2+</sup>-phospholipides<sup>-</sup>) qui vont permettre une activation rapide et massive de prothrombine<sup>110</sup>.

La thrombine va cliver le fibrinogène à deux endroits différents (domaines N-terminaux des chaînes Aα et Bβ) entraînant la formation des fibrinopeptides A et B. Les monomères obtenus vont se polymériser et former le caillot de fibrine. Le FXIII, également activé par la thrombine, en utilisant la fibrine comme cofacteur et avec la présence de calcium, va venir stabiliser le caillot ainsi formé<sup>111</sup>.

**L'inhibition de la cascade de coagulation** fait entrer en jeu les inhibiteurs stœchiométriques et le système de la PC. Le TFPI va former un complexe en liant le FXa avec le FT et le FVIIa (FT/FVIIa/FXa/TFPI) qui va inhiber l'activation du FX et du FIX. Les complexes FT/FVIIa ne seront inhibés qu'après avoir activé du FX. Le TFPI serait également très important dans l'inhibition basale de la coagulation empêchant d'atteindre la phase d'amplification/propagation de la cascade de coagulation dans les zones saines<sup>112,113</sup>.

Le principal inhibiteur de la coagulation est l'AT, elle va piéger la thrombine et le FXa en les fixant par une liaison covalente irréversible. Les complexes formés sont éliminés par le foie<sup>72,114</sup>. En ce qui concerne le système de la PC, c'est un système d'inhibition qui est dynamique. Il n'est actif que si la cascade de coagulation atteint un certain niveau d'activation. La thrombine peut activer la PC, mais c'est liée à la TM que cette activation devient réellement efficace (**Figure 16**). De plus l'activation de la PC en PCa devient encore plus efficace lorsque la PC, accrochée au complexe thrombine/TM, est fixée à l'EPCR. La liaison de la PC à l'EPCR, par l'intermédiaire de ses domaines Gla, lui permet d'être alignée au complexe thrombine/TM et d'augmenter encore d'un facteur 20 sa vitesse d'activation<sup>87</sup>.



**Figure 16 :** Structure et activation de la PC en PCa. A ; schéma de l'activation de la PC par le complexe thrombine-thrombomoduline. Ce complexe permet à la fois l'inhibition des propriétés pro-coagulantes de la thrombine, l'activation de la PC et l'inhibition de la fibrinolyse en activant le TAFI (l'inhibiteur activable par la thrombine de la fibrinolyse). B ; schéma d'activation de la PC en PCa et rôle dans l'inhibition de la coagulation. La PC est rapidement activée par la thrombine. Cette activation va augmenter lorsque la thrombine est liée à la thrombomoduline et la PC à l'EPCR. Une fois activée et libérée de l'EPCR la PCa va se lier à la PS et inhiber le FVa et le FVIIIa, cette inactivation étant catalysée par le FV. Pro : prothrombine ; PS : protéine S ; APC : protéine C activée (d'après Esmon., 2003)<sup>80</sup>.



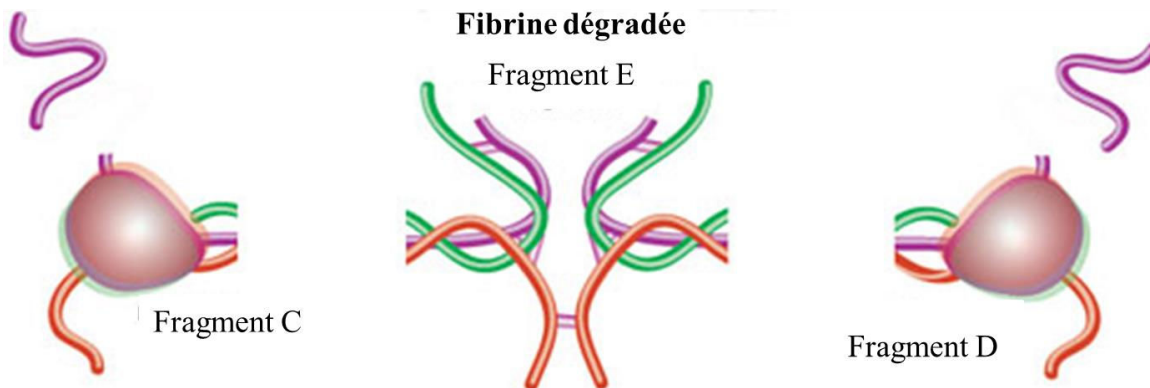
La PC, après activation va se dissocier de l'EPCR et former un nouveau complexe avec la PS, tout en se fixant à la surface des phospholipides membranaires. Les propriétés anticoagulantes du complexe PCa/PS entraînent la protéolyse des facteurs Va et VIIIa, cofacteurs respectifs des complexes ténase et prothrombinase qui permettent l'amplification et la propagation de la génération de thrombine<sup>115</sup>.

Etant un système dynamique, le système de la PC est également régulé. L'activité de la PCa peut être inhibée par l'inhibiteur de la PC (PCI). Cet inhibiteur de 51 kDa est une glycoprotéine de 387 acides aminés présente dans le plasma à une concentration de 3,6 à 6,8 µg/ml et fait partie de la famille des serpins<sup>116,117</sup>. Le PCI est également stocké dans les plaquettes et possède une activité 5 fois supérieures à celle du PCI plasmatique<sup>118</sup>. L'activité inhibitrice du PCI est également augmentée de 20 à 200 en présence d'héparine ou de sulfate de dextran<sup>119,120</sup>. Enfin il est à noter que seulement 30 % du PCI stocké au niveau plaquettaire serait relargué lors de l'activation des plaquettes<sup>118,121</sup>.

Bien que le PCI soit l'inhibiteur principal de la PCa d'autres molécules peuvent également avoir une action inhibitrice sur ce système ( $\alpha_1$  antitrypsine,  $\alpha_2$  macroglobuline).

### II.3.3. La fibrinolyse

La fibrinolyse est le processus final de l'hémostase. Elle permet à la fois de limiter l'étendue du caillot formé par la fibrine et les plaquettes et ensuite de le dégrader en différents fragments (**Figure 17**). La principale enzyme de ce mécanisme est la plasmine<sup>122</sup>.



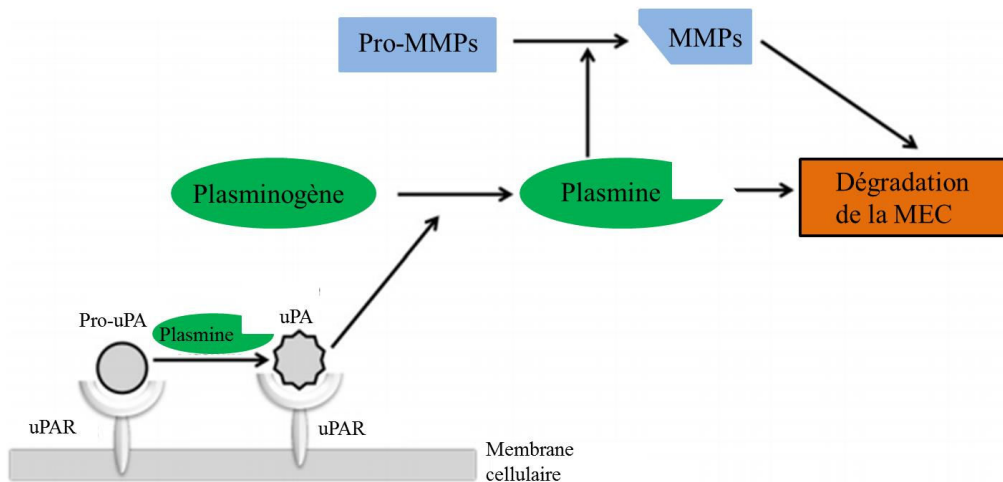
**Figure 17 :** Produits de dégradation de la fibrine après protéolyse par la plasmine (d'après Freedman., 1975)<sup>71</sup>.



Le plasminogène est transformé en plasmine par deux enzymes constituées de deux chaînes peptidiques, le t-PA et l'uPA (**Figure 18**). Ces activateurs sont synthétisés et sécrétés sous une forme inactive constituée d'une seule chaîne peptidique, c'est la plasmine qui va permettre leur activation par coupure protéolytique.

Le t-PA est une sérine protéase synthétisée par les CE ainsi que les cellules dérivées de la lignée hématopoïétique. Le gène du t-PA, appelé PLAT, est porté par le chromosome 8. L'acquisition d'une activité sérine protéase a lieu en clivant les peptides Arg561 et Val562 et cette activité permet la conversion de plasminogène en plasmine.

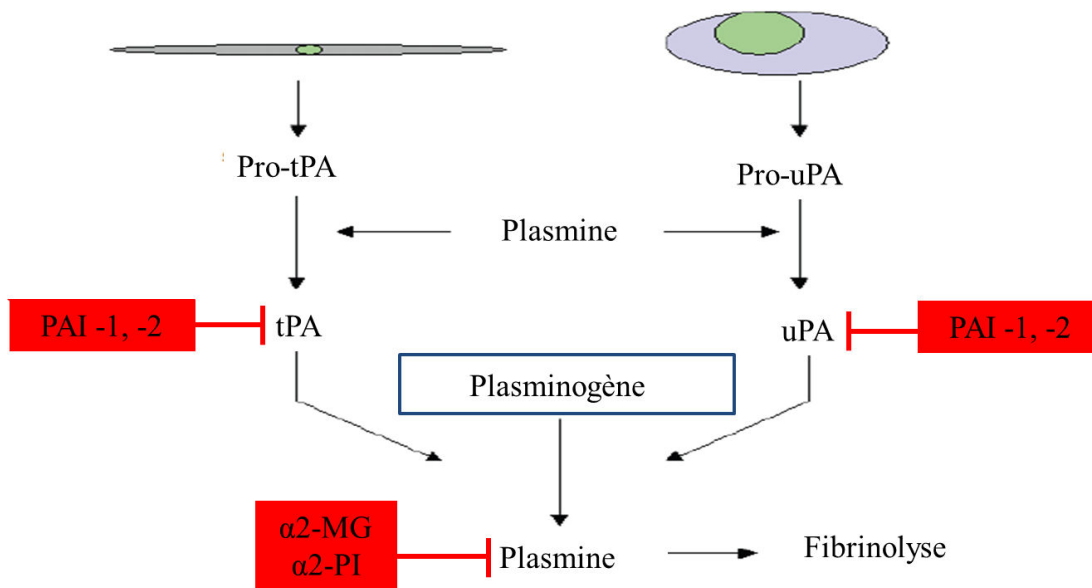
L'uPA, quant à lui, est synthétisé sous une forme inactive et va être activé par clivage protéolytique après fixation à son récepteur (uPAR). Cette sérine protéase de 411 acides aminés possède, en plus de son domaine sérine protéase, un domaine kringle et un domaine EGF et est impliquée dans l'athérosclérose en agissant sur l'adhérence, la migration et la prolifération des CML intervenant dans le remodelage de l'intima ainsi que la dégradation de la MEC<sup>123</sup>.



**Figure 18 :** Système de l'urokinase (uPA) et de son récepteur (uPAR). L'uPA est présent sous une forme inactive (Pro-uPA) qui après s'être fixée à son récepteur peut être activée par la plasmine. L'uPA permet la conversion de plasminogène en plasmine qui, outre son rôle dans la dégradation de la fibrine, va activer les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et participer à la dégradation de la matrice extracellulaire et contribuant ainsi au développement de l'athérosclérose (d'après Fuhrman., 2012)<sup>123</sup>.

La plasmine va permettre la dégradation du caillot en coupant les fibres de fibrine à différents endroits. Les produits de dégradation de la fibrine sont ensuite dégradés par d'autres protéases ou directement évacués par le foie ou les reins.

Ce système est également soumis à régulation puisqu'il existe deux formes de PAI, PAI-1 et PAI-2, toutes deux étant des inhibiteurs de sérines protéases (**Figure 19**). PAI-1 est principalement synthétisé par les CE, son gène (SERPINE1) étant porté par le chromosome 7. PAI-1 est également impliqué dans le développement de l'athérosclérose : dans un contexte inflammatoire, ou en réponse à une stimulation par de l'angiotensine II (Ang II), sa synthèse va augmenter et la dégradation de la fibrine formée dans la paroi vasculaire va diminuer, favorisant alors la progression de la fibrose intravasculaire<sup>124</sup>.



**Figure 19 : Schéma général de la fibrinolyse.** Le plasminogène (zymogène) est converti en sérine protéase active, la plasmine, par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et l'urokinase (uPA). Ces deux activateurs peuvent être inhibés par les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI-1 et PAI-2). La plasmine peut être inhibée par l'inhibiteur  $\alpha_2$ -plasmine ( $\alpha_2$ -PI) principalement, mais également par l' $\alpha_2$ -macroglobuline ( $\alpha_2$ -MG). C'est la plasmine générée qui va activer le tPA et l'uPA à partir de leur forme inactive (Pro-tPA et Pro-uPA) (d'après Cesarman-Maus et coll., 2005)<sup>122</sup>.

## **II.4. Le système rénine angiotensine aldostérone (RAA)**

### **II.4.1. Définition**

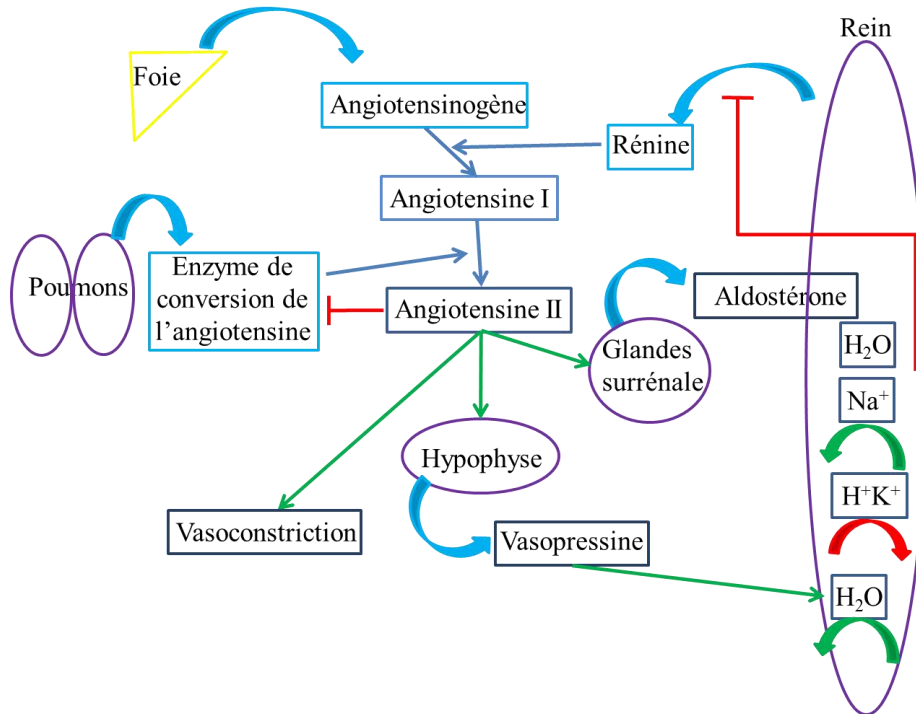
Le système RAA est le système majeur de la régulation de l'homéostasie hydrosodée (**Figure 20**). L'angiotensinogène synthétisé par le foie est la protéine inactive de l'angiotensine I et l'Ang II. La conversion se fait à l'aide de la rénine, protéine sécrétée par les cellules myoépithéliales de l'artériole afférente au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire rénal en cas d'une diminution de la pression de l'artère rénale. La rénine convertit l'angiotensinogène en angiotensine I, cependant cette dernière est inactive jusqu'à protéolyse par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui va la transformer en Ang II. L'Ang II provoque de multiples effets en se fixant à ses récepteurs AT1 et AT2. Le récepteur AT1 permet une augmentation de la pression artérielle (PA) par deux mécanismes principaux :

Au niveau vasculaire il active la vasoconstriction des artérioles par l'intermédiaire de la noradrénaline.

Au niveau rénal, il diminue la perte d'eau dans les urines en stimulant la sécrétion de vasopressine et augmente la réabsorption d'eau et de sodium en stimulant la sécrétion d'aldostérone.

Le récepteur AT2 lui a des actions antagonistes de celles du récepteur AT1 puisqu'il permet une vasodilatation et donc une diminution de la PA.

La régulation de ce système se fait tout d'abord par l'Ang II elle-même, puisqu'elle a un effet inhibiteur concentration dépendant sur la sécrétion de rénine. Le second système de régulation provient de l'aldostérone qui va permettre la réabsorption d'eau et de sodium et augmenter la pression sanguine diminuant ainsi la sécrétion de rénine<sup>125</sup>.



**Figure 20 :** Régulation de la volémie par le système rénine/angiotensine/aldostérone.

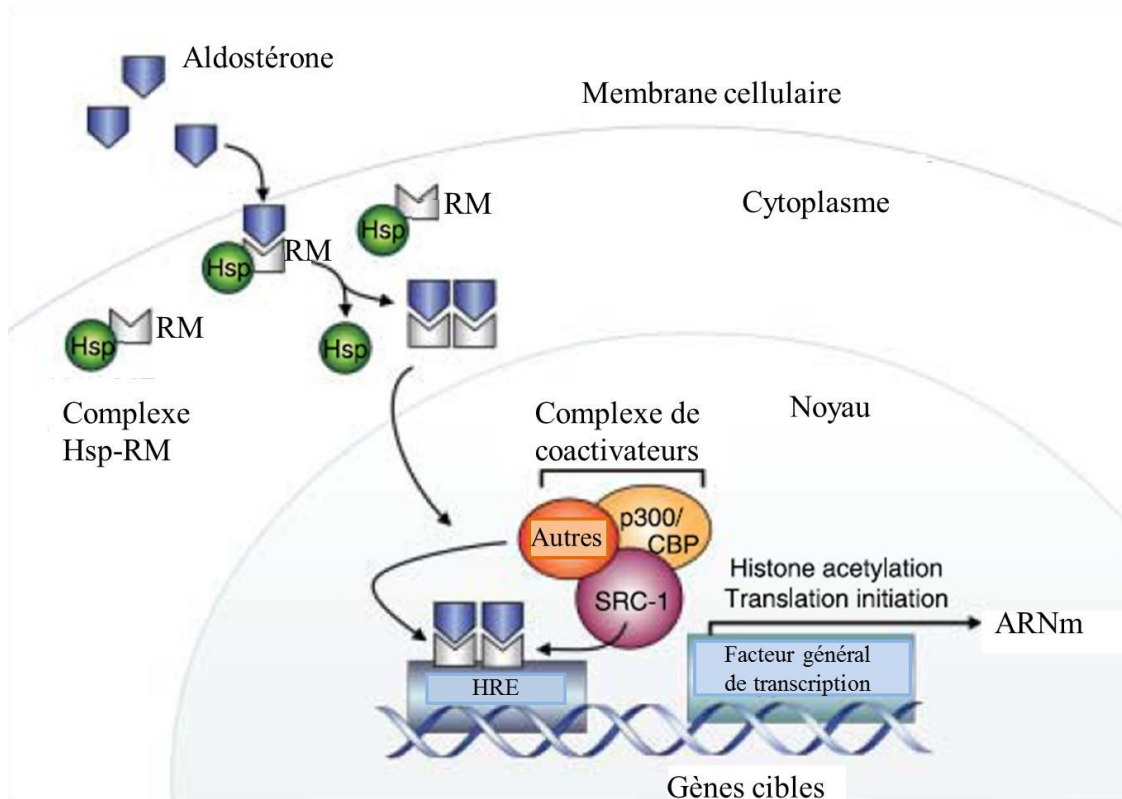
#### II.4.2. L'aldostérone et son récepteur : le récepteur minéralocorticoïde (MR)

L'année 2012 marqua le 60<sup>ème</sup> anniversaire de la découverte de l'aldostérone<sup>126</sup>, un minéralocorticoïde physiologique présent chez les mammifères qui intervient dans le maintien de l'homéostasie d'un grand nombre de systèmes physiologiques.

##### II.4.2.1. Le rôle historique du couple aldostérone/RM

L'aldostérone est synthétisée par les glandes surrénales suite à une stimulation, entre autres, de l'Ang II ou encore de l'hormone adrénocorticotrope (HACT). Le rôle majeur de l'aldostérone réside dans la rétention du sodium et de l'eau dans les tissus épithéliaux de différents organes tels que les reins, le colon ou les glandes salivaires. Cette action a lieu par l'intermédiaire d'un transporteur transépithélial unidirectionnel de sodium, l'ENaC (canal épithélial sodique)<sup>127</sup> (**Figure 21**). L'action des minéralocorticoïdes est permise dans des tissus cibles par l'intermédiaire de deux récepteurs : le récepteur minéralocorticoïde (RM) et le récepteur glucocorticoïde (RG). Ces récepteurs font partie de la famille des facteurs de transcription

nucléaires ligand-dépendants. Ils appartiennent également, tout comme le récepteur aux androgènes, au sous-groupe des récepteurs oxostéroïdes. Le RM et le RG sont deux récepteurs possédant un ancêtre commun<sup>128</sup>. Cette proximité évolutive est à l'origine du lien et de l'interaction pouvant exister entre leurs affinités pour les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes. Le RM a une affinité équivalente pour les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes, tandis que le RG a lui une plus grande affinité pour les glucocorticoïdes<sup>129</sup>. Une fois stimulés par leur agoniste, ces récepteurs vont, par changement conformationnel, se dimériser et fixer leurs séquences de régulation de l'ADN appelées éléments de réponse aux hormones (HREs).



**Figure 21 :** Action de l'aldostérone sur le récepteur minéralocorticoïde (RM). Le RM est présent dans le cytoplasme sous forme inactive car lié à des protéines chaperonnes, ici des protéines de choc thermique (Hsp). Lorsque l'aldostérone va se lier au RM, ce dernier va se dissocier des Hsp et pouvoir être transloqué dans le noyau cellulaire. Un complexe de protéines coactivatrices, formé entre autres par le coactivateur des récepteurs stéroïdes (Src-1) et par la protéine p300 couplée à la protéine de liaison CREB (CBP), va permettre le recrutement du RM et l'acétylation des histones pour aboutir à la transcription des gènes cibles (d'après Yang et coll., 2009)<sup>130</sup>.

## La localisation du RM

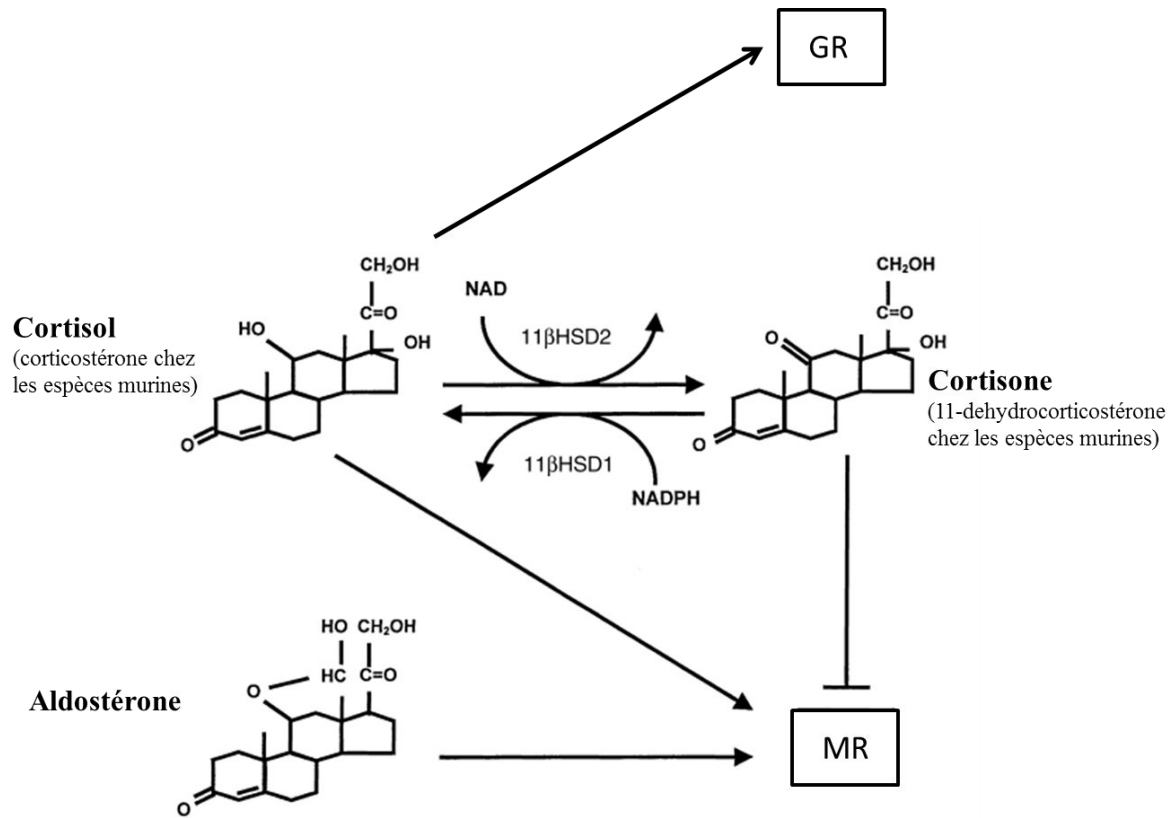
La grande hétérogénéité d'action des hormones minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes en fonction des organes où elles interviennent réside dans leur aptitude à fixer à la fois le RM et le RG.

Le RM est synthétisé au niveau de plusieurs organes en plus des reins : le système nerveux (en particulier l'hypothalamus)<sup>131</sup>, le colon, le tissu adipeux, les glandes salivaires, mais également le cœur et les cardiomyocytes<sup>132</sup>, et les vaisseaux avec une expression à la fois au niveau de l'endothélium et au niveau des CML.

Il existe plusieurs antagonistes possédants différentes affinités pour le récepteur RM<sup>133</sup>. La spironolactone qui possède, en plus de son activité inhibitrice du RM une activité anti-androgénique et des propriétés œstrogéniques ainsi que la capacité d'inhiber la 11 $\beta$ -hydroxystéroïdes déshydrogénases de type 1 (HSD1). La spironolactone a été utilisée depuis 1959 comme antihypertenseur et diurétique<sup>134</sup>. Cette hormone de synthèse a ensuite été remplacée par des anti-RM plus spécifiques telle que l'éplérenone. Cet antagoniste du RM, en plus d'être indiqué en cas d'hypertension est utilisé chez les patients ayant eu un infarctus du myocarde ou une insuffisance cardiaque (IC)<sup>135-138</sup>. Le RU 28318 peut également être utilisé comme antagoniste du RM, il est également bien plus spécifique pour ce récepteur que ne l'est la spironolactone<sup>139</sup>.

## Le système HSD1/HSD2

La possibilité que le RM soit activé par l'aldostérone et non par des glucocorticoïdes dans un tissu dépend de l'activité de deux enzymes aux fonctions opposées, la HSD1 et la 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (HSD2). Chez l'homme, ces enzymes convertissent le cortisol en cortisone, chez les espèces murines c'est la corticostérone qui est convertie en 11-déshydrocorticostérone<sup>140</sup> (**Figure 22**).



**Figure 22 :** Actions des enzymes 11β-HSD1 (11β-Hydroxystéroïde déhydrogénase) type 1 et 2  
 Les enzymes 11β-HSD1 et 11β-HSD2 prédéterminent une réponse préférentielle du récepteur minéralocorticoïde (MR) ou du récepteur glucocorticoïde (GR) au sein d'un tissu donné (après Ferrari et coll., 2000)<sup>141</sup>.

L'action de l'aldostérone au niveau du rein est possible par la forte activité au niveau de cet organe de la HSD2 qui inactive les glucocorticoïdes normalement présents en concentration 100 à 1000 fois plus importante que l'aldostérone. Dans tous les tissus, c'est la balance entre l'expression de la HSD1 et la HSD2 qui va faire prévaloir l'action du RM ou du RG. La HSD1 est exprimée fortement dans le foie, les reins, les ovaires, et le tissu adipeux<sup>142,143</sup>. La HSD2 est présente dans les reins, le colon, le placenta, les glandes parotides<sup>144,145</sup>. Chez la souris, la HSD1 est présente dans le foie, les reins, l'intestin grêle, l'estomac, les poumons, le tissu adipeux, le thymus ou encore la rate. La HSD2 est synthétisée dans les reins, le colon, l'estomac, l'épididyme<sup>146</sup>.

#### II.4.2.2. L'aldostérone et le RM

Depuis les années 1990 le panel d'actions de l'aldostérone s'est élargi avec notamment la découverte d'une action profibrotique au niveau du cœur<sup>147</sup>. L'excès d'aldostérone circulant concomitant à l'augmentation de la PA est lié au développement d'une dysfonction endothéliale<sup>148</sup>. Cette altération endothéliale peut intervenir par l'intermédiaire d'un dysfonctionnement de l'activation du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR). En effet des souris déficientes pour l'activité tyrosine kinase de l'EGFR se caractérisent par un état de stress oxydatif augmenté et une dysfonction endothéliale<sup>149</sup>. Au niveau des CE aortiques humaines en culture, l'aldostérone provoque la sécrétion de vWF et d'IL-8. Le fait que la sécrétion de vWF soit inhibée par un prétraitement à la spironolactone indique une activation de l'endothélium par l'aldostérone<sup>150</sup>.

L'hypothèse selon laquelle l'aldostérone est liée au développement de l'athérosclérose a été émise. En effet, la concentration plasmatique d'aldostérone est associée à la progression de l'athérosclérose au niveau de la plaque carotidienne lors d'un suivi de deux ans de patients présentant une progression de cette plaque<sup>151</sup>. Chez des souris apolipoprotéine-E déficientes (APO-E) avec athérosclérose induite par un régime faible en sodium qui a également pour effet d'augmenter la concentration plasmatique d'aldostérone, un traitement de 10 semaines à l'éplérenone provoque une diminution de la gravité des lésions vasculaires. Cet effet d'un antagoniste du récepteur MR pourrait être lié à une diminution du phénotype pro-inflammatoire des macrophages. En effet, le traitement à l'éplérenone diminue les cytokines proinflammatoires, telles que l'IL-6, la molécule chémoattractante des monocytes (MCP-1), la protéine C réactive, ou encore ICAM<sup>152</sup>. Cet effet de l'aldostérone sur les cellules du système immunitaire pourrait être la conséquence de l'une de ses actions sur les CE, à savoir l'augmentation de la synthèse de molécules d'adhérences. La synthèse de molécules d'adhérence, ICAM, VCAM, E-Selectine est augmentée dans les CE en réponse à l'aldostérone<sup>153</sup>. La conséquence est une augmentation de la capacité d'adhérence des leucocytes ou les polynucléaires<sup>154,155</sup>. L'implication du récepteur RM reste à démontrer car des CE exprimant de manière stable le RM et traitées à l'aldostérone (à une



dose plus faible que les études précédentes) ne présentent pas de modification de la synthèse d'ICAM<sup>156</sup>.

L'hyperaldostéronisme est associé aux atteintes vasculaires et aux évènements cardiovasculaires. L'excès d'aldostérone chez des sujets hypertendus provoque une importante altération de la réactivité endothéliale due à une forte diminution de la synthèse de NO. Un traitement de 3 mois avec de la spironolactone permet de doubler la capacité de vasodilatation de l'artère brachiale<sup>157</sup>.

Les progéniteurs endothéliaux, qui interviennent dans la réparation des brèches vasculaires ont des capacités de différenciation, de migration ou encore de prolifération altérées par l'aldostérone. Cette action se fait par l'intermédiaire du RM, mais sans interaction avec le rôle de l'aldostérone sur la rigidité artérielle. Cette action a lieu par l'intermédiaire de la protéine kinase (PK) A qui augmente la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)<sup>158</sup>.

Les souris et l'homme expriment les HSD au niveau vasculaire, cependant les cellules et les territoires synthétisant ces enzymes sont encore discutés. Christy et coll ont trouvé une expression de HSD1 dans toutes les couches de l'aorte, tandis que la HSD2 est localisée uniquement au niveau des CE<sup>159</sup>. Nguyen Dinh Cat et coll ont également exploré l'expression aortique des HSD. Une expression à la fois au niveau des CML et au niveau de l'endothélium a été trouvée pour HSD1 alors que l'HSD2 est exprimée uniquement au niveau de l'endothélium<sup>160</sup>. Chez l'homme la synthèse d'HSD2 ne semble pas spécifique de l'endothélium puisqu'elle existe dans les CML au niveau artériel, veineux et dans les cardiomyocytes<sup>161,162</sup>. Cependant, l'expression de HSD2 au niveau endothélial est en faveur d'une action de l'aldostérone sur ces cellules. De plus, des souris invalidées pour l'expression de HSD2 présentent une dysfonction endothéliale avec augmentation de la vasoconstriction due à une altération de la production de NO<sup>163</sup>. De la même manière, et pour rejoindre l'hypothèse d'une implication de l'aldostérone dans le développement de l'athérosclérose, des souris invalidées à la fois pour APO-E et pour HSD2 présentent une altération de l'endothélium et une aggravation de l'athérosclérose<sup>164</sup>.

### II.4.2.3. L'impact de l'aldostérone sur l'hémostase

L'impact de l'aldostérone dans l'hémostase est encore sujet à discussion. Dans un modèle de thrombose chez le rat l'injection d'aldostérone (30 µg/kg/h) augmente la masse du thrombus et diminue la fibrinolyse (par augmentation de PAI-1 et de TAFI). Une augmentation d'un facteur 6 des concentrations en FT est également observée. Toutes ces variations sont prévenues par l'administration d'éplérenone<sup>165</sup>. Cette même équipe a montré en 2010 avec le même protocole que l'aldostérone diminuait le temps de saignement, via une diminution de la NOS et du NO tout en augmentant le stress oxydant par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la SOD. De la même manière que pour l'étude précédente l'administration d'éplérenone normalise les marqueurs de stress oxydatif<sup>166</sup>.

Ma et coll ont montré qu'un antagoniste du RM, la spironolactone, permettait de diminuer la concentration de PAI-1 chez des sujets normotendus et d'améliorer la fonction fibrinolytique chez des sujets hypertendus par augmentation du t-PA<sup>167</sup>.

L'aldostérone et son récepteur pourraient également être impliqués dans l'augmentation du risque de thrombose imputable aux contraceptifs oraux de quatrième génération, par rapport aux contraceptifs des générations précédentes<sup>168</sup>. En effet l'une des molécules présentes dans ces pilules, la drospirénone, possède en plus de ses propriétés progestatives et anti-androgéniques, une forte affinité pour le RM<sup>169</sup>.

L'EPCR augmente l'activation thrombine-TM dépendante de la PC. Ce récepteur transmembranaire est présent à la surface des CE<sup>85</sup>. Ducos et coll ont montré qu'un traitement avec de l'aldostérone de CE augmentait la synthèse d'EPCR de manière RM dépendante<sup>170</sup>. Cette action de l'aldostérone sur un système anticoagulant est une nouvelle facette de cette hormone qui jusque-là n'a pas été étudiée.

## II.5. Le syndrome métabolique (SMet)

Les premières descriptions d'un syndrome regroupant plusieurs anomalies métaboliques ont eu lieu au début des années 1920. Ainsi, Kylin décrit un syndrome impliquant hypertension, hyperglycémie et hyperuricémie<sup>171</sup>. Le terme de syndrome métabolique a commencé à être utilisé dans la deuxième moitié du vingtième siècle<sup>172</sup>. Cependant, la définition du SMet et des

anomalies comprises dans ce syndrome, n'ont réellement été officialisées qu'aux environs des années 2000 par la WHO (World Health Organisation) et la NCEP ATP III (National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III).

Définition de la WHO<sup>173</sup> :

Selon les critères de 1999, une personne est atteinte du SMet si elle présente l'un des signes de diabète de type 2, que ce soit une intolérance au glucose ou une résistance à l'insuline ainsi que deux des critères suivants :

- une pression sanguine supérieure à 140/90 mmHg
- une dyslipidémie : triglycérides supérieurs à 1,695 mmol/l et des lipoprotéines de haute densité (HDL) inférieures à 0,9 mmol/l (pour les hommes) et 1,0 mmol/l (pour les femmes)
- une obésité centrale avec un indice de masse corporelle supérieur à 30
- une microalbuminémie : un ratio créatinine/albumine supérieur à 30 mg/g

Définition du NCEP ATP III<sup>174</sup>:

- tour de taille élevé (plus de 102 cm pour les hommes et plus de 88 cm pour les femmes)
- triglycérides élevés : égaux ou supérieurs à 1,7 mmol/l
- un taux de HDL inférieur à 1,03 mmol/L chez les hommes et inférieur à 1,29 mmol/l chez les femmes
- une PA égale ou supérieure à 130/85 mmHg (ou la présence d'un traitement contre l'hypertension)
- une hyperglycémie égale ou supérieure à 5,6 mmol/l (ou la présence d'un traitement contre l'hyperglycémie)

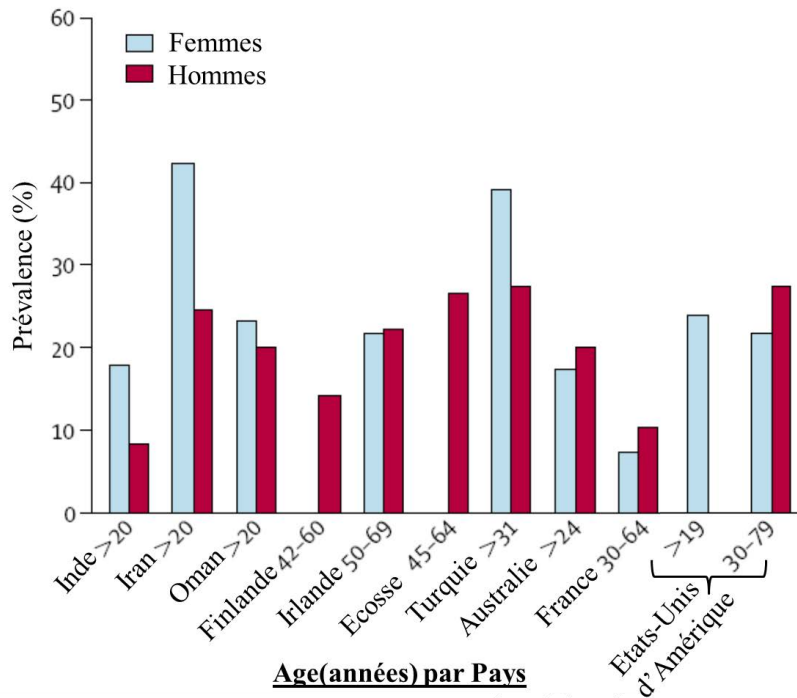
La fédération internationale de diabète (IDF) a utilisé les paramètres facilement observables en pratique clinique pour définir le SMet<sup>175</sup>. Pour l'IDF le critère nécessaire pour présenter un SMet est l'existence d'une obésité abdominale (définie par la mesure du tour de taille). Cette obésité doit ensuite être associée à au moins trois des quatre anomalies suivantes :

- hypertriglycéridémie (triglycérides supérieurs à 1,7 mmol/l)
- diminution du HLD-cholesterol (inférieur à 1,03 mmol/l chez l'homme, et inférieur à 1,29 mmol/l chez la femme), ou traitement débuté contre la dyslipidémie

- hypertension artérielle (supérieure à 130/85 mmHg) ou traitement en cours contre l’hypertension
- hyperglycémie à jeun (supérieure à 5,6 mmol/l), ou un diabète de type 2 préalablement diagnostiqué

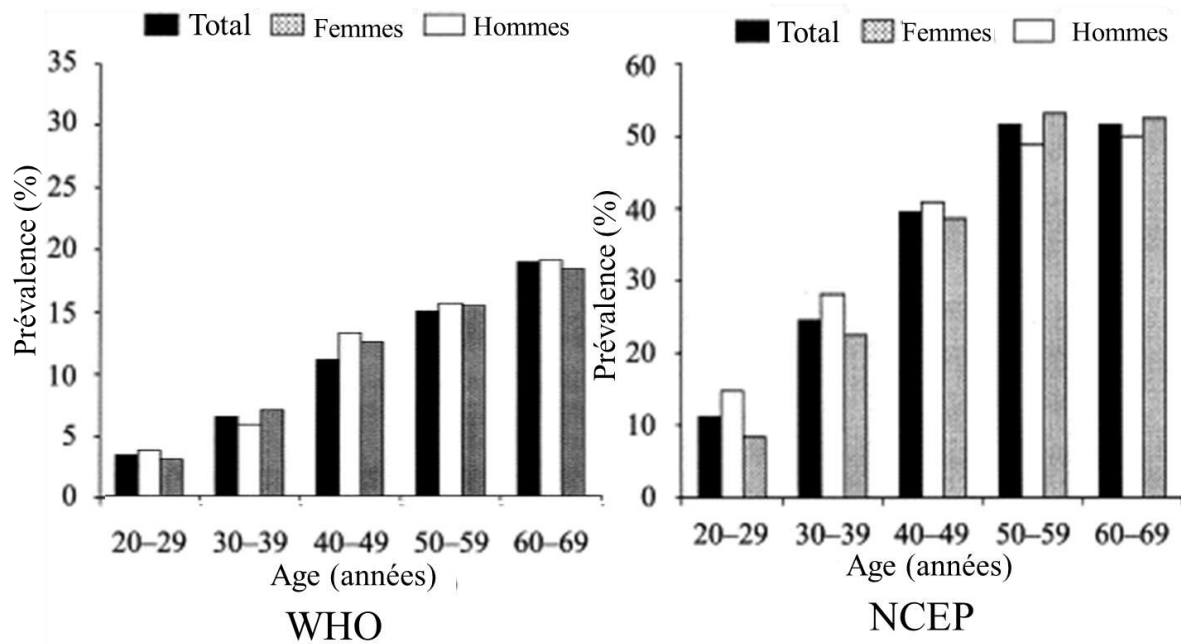
**Prévalence**

La prévalence du SMet est très différente en fonction des pays, des catégories des personnes et même de la définition utilisée. Au regard de la définition de l’ATP III, plus de 20 % de la population des Etats-Unis d’Amérique est atteinte du SMet (**Figure 23**). La France compte deux fois moins de cas de SMet. En ce qui concerne les variations observées entre les hommes et les femmes, elles peuvent être dues à des facteurs culturels et des facteurs hormonaux puisqu’après la ménopause une modification du métabolisme des lipides est observée<sup>176</sup>. Seulement 6 % des adultes ayant une masse corporelle normale sont atteints de syndrome métabolique contre près de 60 % des adultes obèses. Il y a eu 460 000 morts au Etats-Unis en 2000 des suites de maladies coronaires<sup>177</sup>.



**Figure 23 :** Prévalence du syndrome métabolique. La prévalence est donnée selon la définition du NCEP ATP III (d’après Eckel et coll., 2005)<sup>178</sup>.

La modification des paramètres utilisés dans la définition du SMet peut également faire varier du simple au double le nombre de personnes présentant un SMet<sup>179,180</sup> (**Figure 24**).



**Figure 24 :** Prévalence du syndrome métabolique à Mexico en fonction de la définition utilisée (d'après Aguilar-Salinas et coll., 2004)<sup>179</sup>.

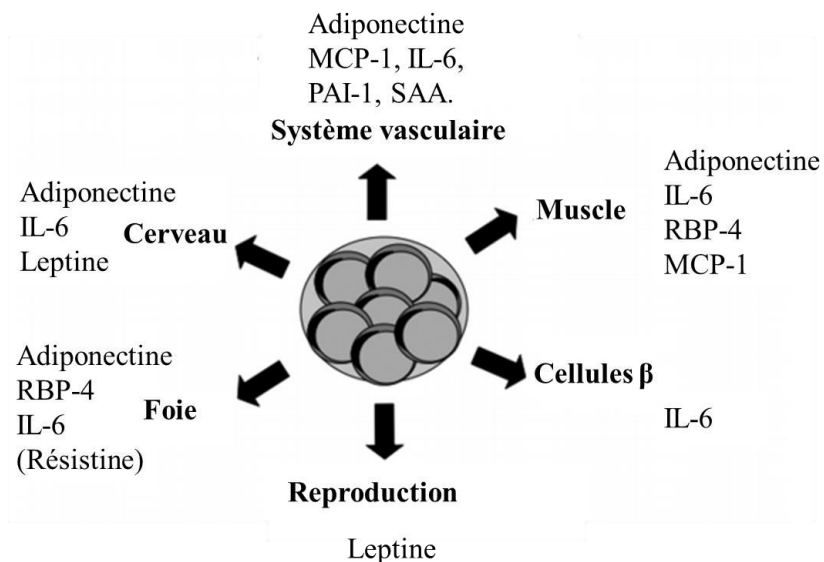
Bien que la définition et les paramètres à utiliser dans la définition du SMet soient toujours débattus, il est admis que le SMet est lié à un état d'inflammation chronique de bas niveau<sup>181</sup> et augmente le risque de thrombose<sup>182</sup>.

### II.5.1. L'altérations métaboliques et l'inflammation dans le cadre du SMet

Le SMet est la conséquence de modifications importantes du métabolisme d'un certain nombre de types cellulaires, ce qui va provoquer une modification globale et potentiellement délétère des équilibres homéostatiques.

En premier lieu, liée à l'augmentation des graisses corporelles, il y a une modification du phénotype des adipocytes. Historiquement le tissu adipeux a été réparti en deux types : les

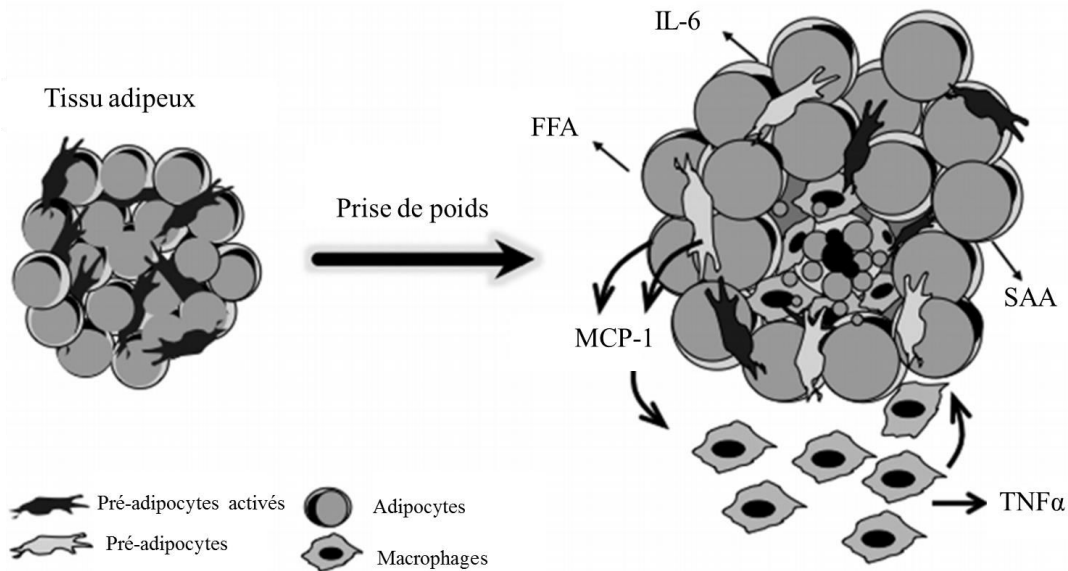
graisses blanches et les graisses brunes, les premières ayant un rôle de stockage et les autres de thermogénèse. Cependant, depuis quelques années, le tissu adipeux est considéré comme une glande endocrine (mais également paracrine et autocrine) à part entière. En effet, au niveau de la graisse blanche des facteurs intervenant dans un certain nombre de fonctions sont synthétisés : des facteurs liés à la régulation du stockage de glucose (leptine, adiponectine), des chémokines (MCP-1) ou encore des cytokines anti-inflammatoires (antagoniste du récepteur à l'IL-1 : IL-1Ra) et pro-inflammatoires (IL-6)<sup>183</sup> (**Figure 25**).



**Figure 25 :** Relations existantes entre les molécules synthétisées par le tissu adipeux et les autres organes. MCP-1 : protéine chémoattractante 1 des monocytes ; IL-6 : Interleukine-6) ; RBP-4 : protéine de liaison 4 au rétinol ; SAA : sérum amyloïde A (d'après Gustafson., 2009)<sup>183</sup>.

L'obésité provoque une hypertrophie des adipocytes ainsi qu'une modification de leur métabolisme. Les adipocytes de personnes obèses vont présenter une lipolyse augmentée de 50 % par rapport à des sujets non obèses. Ils sécrètent également une plus grande quantité de marqueurs tels que des cytokines (IL-6, IL-8), de l'angiotensinogène ou encore de PAI-1 qui sont des acteurs de l'état d'inflammation chronique qui caractérise les sujets obèses<sup>183</sup>. L'obésité viscérale joue un rôle plus important dans l'inflammation que l'obésité sous-cutanée. Il existe une augmentation de la concentration en IL-6 de 50 % au niveau de la veine porte, veine qui draine le tissu adipeux viscéral, par rapport à une artère contrôle, l'artère radiale<sup>184</sup>.

L'autre aspect impliqué dans l'état inflammatoire chronique propre aux sujets obèses est l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux. La proportion de macrophages présents dans les tissus adipeux blancs de sujet obèses représenterait près de 50 % du total des cellules contre seulement 10 % chez des sujets non obèses. De plus, des macrophages activés par l'état d'inflammation chronique relarguent des molécules qui entretiennent cette inflammation telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 ou encore l'IL-1<sup>185</sup> (**Figure 26**).



**Figure 26 :** Mise en place et l'amplification de l'inflammation chronique dans le syndrome métabolique. La prise de poids est associée à une modification du phénotype des adipocytes. Les adipocytes vont grossir et sécréter des acides gras libres (FFA) des molécules proinflammatoires, comme l'IL-6 (interleukine 6) ou le sérum amyloïde A (SAA), ou encore des molécules qui vont recruter et activer des monocytes, telles que MCP-1 (protéine chémoattractante 1 des monocytes). Les monocytes, une fois différenciés en macrophages, vont également participer à l'inflammation en sécrétant des cytokines proinflammatoires comme le TNF- $\alpha$  (facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ ) (d'après Gustafson., 2009)<sup>183</sup>.

Le SMet est également indissociable d'un défaut de métabolisme et de transport du glucose. Le SMet touche 10 % des sujets ayant une tolérance au glucose normale, 50 % des sujets ayant une intolérance au glucose, et 80 % des sujets atteints de diabète de type 2<sup>186</sup>. Bien que la chronologie de la mise en place de l'intolérance au glucose par rapport à la résistance à l'insuline ne soit pas encore très claire, les modifications métaboliques inhérentes à chacune de ces anomalies métaboliques sont, elles, globalement comprises.

Chez un sujet sain, le pancréas peut augmenter la sécrétion d'insuline en réponse à une augmentation de la concentration sanguine de glucose ou dans le cas d'une résistance à l'insuline. Avec le temps et une forte sollicitation, les cellules devant répondre à l'insuline, deviennent résistantes et l'effet de l'insuline décroît. Cet état qui est appelé « résistance à l'insuline » est aujourd'hui une anomalie métabolique majeure. Elle atteignait 200 millions de personnes au début du 21<sup>ème</sup> siècle dans le monde. Par la suite, les cellules  $\beta$  du pancréas, qui sécrètent l'insuline, ne réussissent plus à compenser la résistance à l'insuline ce qui peut aboutir à la mise en place d'un diabète de type 2<sup>187</sup>.

Plusieurs pistes quant à la mise en place d'une résistance à l'insuline existent dont l'inflammation chronique liée à l'obésité qui aurait un rôle prépondérant à jouer puisqu'il existe une forte corrélation entre les taux circulants d'IL-6 et la diminution de sensibilité à l'insuline<sup>188</sup>.

Directement lié au stress dû à l'inflammation chronique et à la difficulté à emmagasiner le glucose, un remodelage vasculaire s'opère chez les patients atteints de SMet. Environ 50 % des patients atteints de diabète de type 2 sont hypertendus et ont une rigidité artérielle accrue. Il a été montré que l'augmentation de la rigidité artérielle était liée à une augmentation de la pression sanguine et de l'intolérance au glucose et qu'elle était une résultante de la mise en place d'une dysfonction endothéliale<sup>189</sup>.

### **II.5.2. L'impact du SMet sur l'hémostase**

L'obésité est associée à une augmentation du risque de développer une maladie cardiovasculaire<sup>186</sup>, comme par exemple un épisode thromboembolique veineux. Ainsi 60 % des patients présentant des thromboses sont en surpoids ou obèses<sup>190</sup>. La mauvaise régulation de l'hémostase fait partie intégrante du SMet bien qu'elle n'entre pas encore dans les paramètres permettant de le définir. Les patients présentant un SMet ont une augmentation globale de la réactivité de l'hémostase incluant une augmentation de la réactivité de la coagulation et une diminution de la fibrinolyse<sup>191</sup>. L'inflammation chronique présente dans le SMet participe à l'augmentation de la synthèse de facteurs procoagulants tels que le FT en activant la voie du NK- $\kappa$ B<sup>192,193</sup>. Le SMet est également lié à une augmentation des concentrations en FVII et vWF<sup>194</sup>. L'anomalie la plus décrite concerne la fibrinolyse avec une diminution des capacités



fibrinolytiques concomitante à une diminution de PAI-1<sup>191,195,196</sup>. De la même manière l'activation plaquettaire est augmentée conférant là encore un phénotype procoagulant<sup>197</sup>. Enfin, le SMet et l'inflammation sont associés avec la formation de microparticules qui peuvent être prothrombogènes<sup>198,199</sup>.

Cette partie a fait l'objet d'une revue : Hypertension, hypercoagulability and the metabolic syndrome: a cluster of risk factors for cardiovascular disease (XI. Articles et communications en congrès).

## **II.6. L'hypertension artérielle (HTA)**

### **II.6.1. Définition de l'HTA**

L'HTA chez l'homme se caractérise par la présence d'une pression systolique supérieure à 140 mmHg et une pression diastolique supérieure à 90 mmHg. L'hypertension est également séparée en deux types, l'hypertension primaire et l'hypertension secondaire, la première, qui représente 95 % des cas, étant une hypertension mise en place sans cause médicale connue, la seconde avec une cause médicale (dysfonctionnement des reins, du cœur ou du système endocrinien). L'hypertension est un facteur de risque majeur qui augmente les risques d'infarctus du myocarde, d'anévrisme mais également l'une des causes de l'IC<sup>200</sup>.

En France, cette pathologie touche 10 à 15 % de la population, tandis qu'à l'échelle mondiale près d'un quart de la population serait touchée, ce qui représente un enjeu majeur de santé publique et un coût important de traitement<sup>201,202</sup>.

Outre des facteurs génétiques qui peuvent augmenter les chances de développer une hypertension, plusieurs facteurs métaboliques environnementaux ont été identifiés comme impliqués dans l'hypertension artérielle. C'est le cas de l'obésité, de la résistance à l'insuline (deux caractéristiques qui peuvent être trouvées chez des patients souffrant de SMet, voir **paragraphe II.6**), le vieillissement, le manque d'exercice, le stress, un apport trop important en sel, ou trop faible en potassium<sup>203,204</sup>.

L'hypertension systolique du sujet âgé est le plus souvent liée à la rigidité artérielle. En effet, la rigidité artérielle et le remodelage vasculaire sont les principaux acteurs de l'hypertension. La diminution de la proportion d'élastine par rapport au collagène dans la média associée à une augmentation de la fibronectine va diminuer l'élasticité artérielle. Ce remodelage artériel ajouté et une dysfonction de l'endothélium et notamment de sa capacité à produire du NO vont être les causes centrales de la mise en place de l'hypertension essentielle<sup>205</sup>.

La principale manifestation du vieillissement artériel est la rigidification des gros vaisseaux. Cette rigidification est un facteur de risque indépendant de morbidité et de mortalité<sup>206207</sup>.

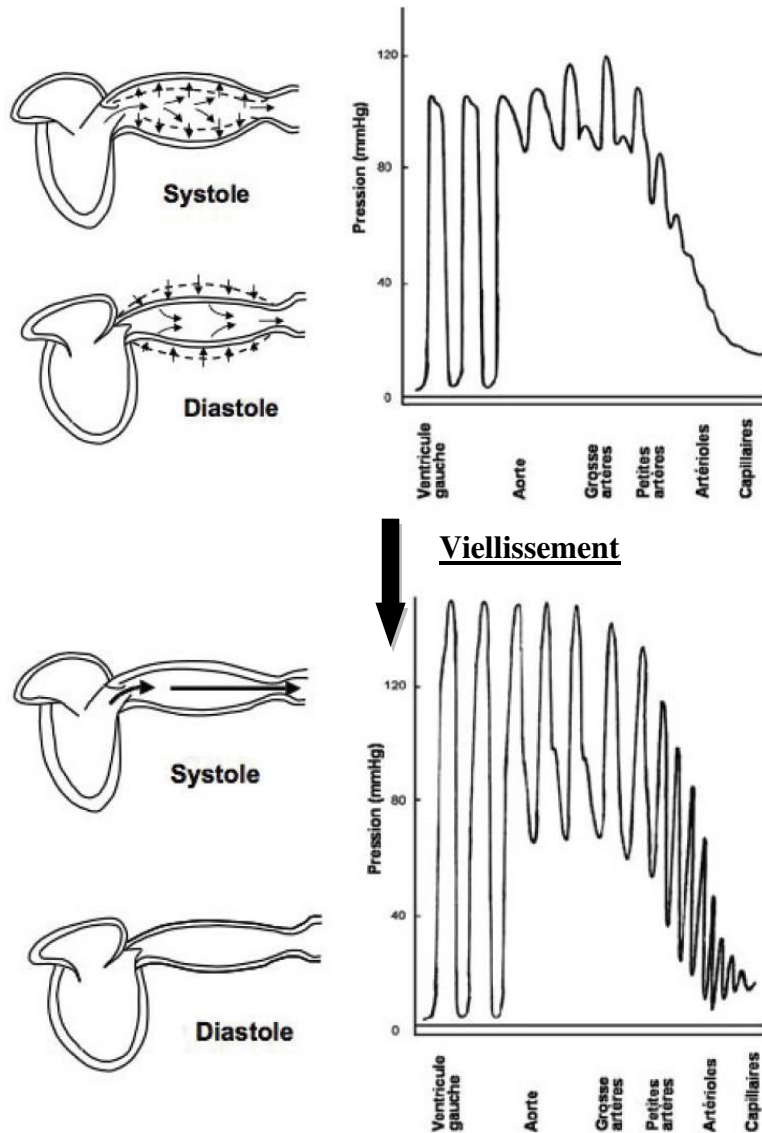
### **II.6.2. Les modifications fonctionnelles et structurales des gros troncs artériels avec le vieillissement**

L'élasticité correspond à la capacité d'un corps à se déformer et à reprendre sa forme initiale après avoir été soumis à une contrainte. Selon la loi de Hooke, un corps purement élastique subit une déformation proportionnelle à la contrainte à laquelle il est soumis, et ce, de manière instantanée. Un corps, comme une artère, est dit visco-élastique puisque sa déformation à la suite d'une contrainte n'est pas instantanée et va dépendre de sa composition.

Cette élasticité est très importante en ce qui concerne l'amortissement aortique (la transformation du flux cardiaque pulsatile en un flux continu). L'élasticité pariétale dépend principalement de la présence des fibres élastiques. L'élastine, très extensible, est organisée en un réseau de lames élastiques continues, parallèles et concentriques<sup>208</sup>.

L'un des effets du vieillissement est la perte progressive des propriétés élastiques de la paroi artérielle.

Le vieillissement a également des répercussions sur la structure et la fonction des artères. La transformation du flux sanguin, pulsatile au niveau cardiaque et continu en périphérique obéit au modèle de Windkessel. Cette propriété est altérée par le vieillissement et la rigidification des artères (**Figure 27**)<sup>208</sup>.



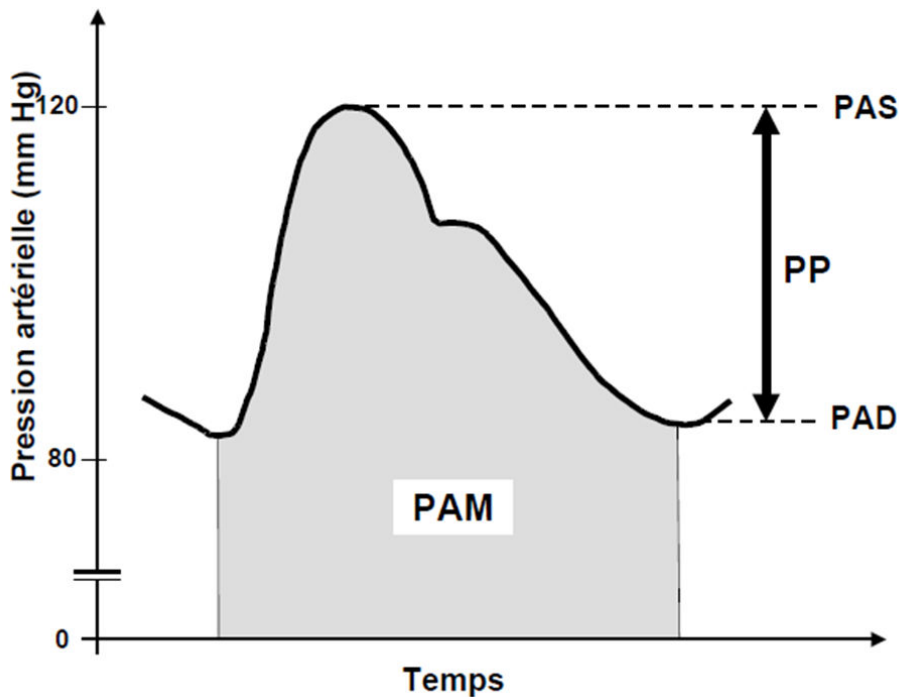
**Figure 27 :** Modification de l'effet « Windkessel » avec le vieillissement. L'effet « Windkessel » correspond à la capacité qu'à l'artère aortique, par sa compliance, à emmagasiner une partie du sang éjecté lors de la systole pour le restituer lors de la diastole et ainsi permettre la transformation d'un flux sanguin pulsatile en un flux continu. Cet effet est altéré avec le vieillissement, et se traduit par une rigidification des parois vasculaires (d'après O'Rourke et coll., 2007)<sup>208</sup>.

Les contraintes pulsatiles appliquées à la paroi artérielle provoquent des cassures dans les fibres élastiques et une désorganisation du réseau élastique. Les contraintes de déformation se transmettent alors au collagène dont la capacité à se déformer est 10 à 30 fois inférieure à celle de l'élastine<sup>209,210</sup>.

Le vieillissement artériel est lié à un remodelage hypertrophique excentrique de la paroi associant épaissement et dilatation de l'artère. Cette dilatation se caractérise par une augmentation des diamètres interne et externe des gros troncs artériels aboutissant à une hypertrophie<sup>211</sup>.

### II.6.2.1. Augmentation de la pression pulsée (PP)

La PP correspond à la différence entre le pic de pression systolique et la pression diastolique (**Figure 28**). Elle est en moyenne de 30 à 45 mmHg chez un individu sain<sup>212</sup>.



**Figure 28 :** Schéma de la pression pulsée. PAS : pression artérielle systolique ; PAD : pression artérielle diastolique ; PAM : pression artérielle moyenne ; PP : pression pulsée.

La PP va dépendre du volume sanguin éjecté par le ventricule gauche durant la systole et de l'élasticité artérielle. Plus le volume éjecté par le ventricule est élevé plus la compliance artérielle est faible et plus la PP sera importante. La PP est également déterminante dans le remodelage vasculaire<sup>210</sup>. Lors du vieillissement artériel auquel est associé une rigidification artérielle une augmentation de la PP sera donc observée<sup>213</sup>.

### II.6.2.2. Augmentation de la vitesse d'onde de pouls (VOP)

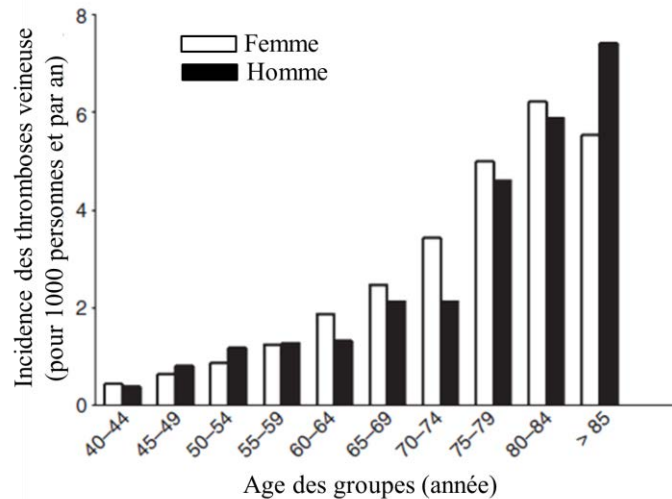
L'onde de pouls est l'onde de PA qui se propage le long de l'aorte à chaque battement cardiaque. De la même manière que les ondes des tremblements de terre se propagent plus rapidement lorsque les couches qu'elles traversent sont rigides, la VOP sera d'autant plus rapide que la compliance artérielles diminuera. Chez un sujet sain, la VOP est d'environ 3 à 5 m/s<sup>212</sup>. L'onde de pouls n'est pas constante le long de l'aorte. Elle n'est pas directement influencée par les ondes de réflexion au niveau des bifurcations artérielles le long de la partie abdominale de l'aorte mais elle est considérée comme un indice de rigidité global<sup>212,214</sup>.

### II.6.3. L'impact de l'hypertension sur l'hémostase

L'hypertension artérielle non traitée augmente les risques de thrombose due à l'athérosclérose. Les variations de PA peuvent également directement influencer l'hémostase. Des taux de FVII, de fibrinogène (et de D-dimère) sont augmentés chez des patients hypertendus suggérant un état hypercoagulable<sup>215-217</sup>. Cependant, une augmentation des facteurs anticoagulants AT et PC a également été observée. Au laboratoire une augmentation de la synthèse de TFPI au niveau de CML soumises à des contraintes mécaniques a été démontré<sup>218</sup>. Ce résultat a été mis en lien avec l'augmentation du TPFPI dans un contexte de rigidité artérielle chez des sujets de plus de 60 ans. Au niveau de modèles animaux, le rat avec une hypertension induite au deoxycorticostérone acétate présente une augmentation des complexes thrombine-antithrombine (TAT) en faveur d'une augmentation de la génération de thrombine in vivo. De plus, une augmentation du FT avec une diminution en TM, font pencher la balance vers un état procoagulant<sup>219,220</sup>. Chez le rat SHR, une augmentation de la concentration en prothrombine et en fibrinogène a été montrée avec également une augmentation des concentrations d'AT, tendant globalement vers un état procoagulant<sup>221</sup>. Ces données suggèrent que l'hypertension pourrait induire un état procoagulant. L'augmentation du risque de thrombose présent chez les patients hypertendus résulte à la fois de l'altération de la paroi vasculaire conduisant à une augmentation du risque de rupture des plaques d'athéromes et à une diminution la capacité anticoagulante des CE.

#### II.6.4. L'impact du vieillissement sur l'hémostase

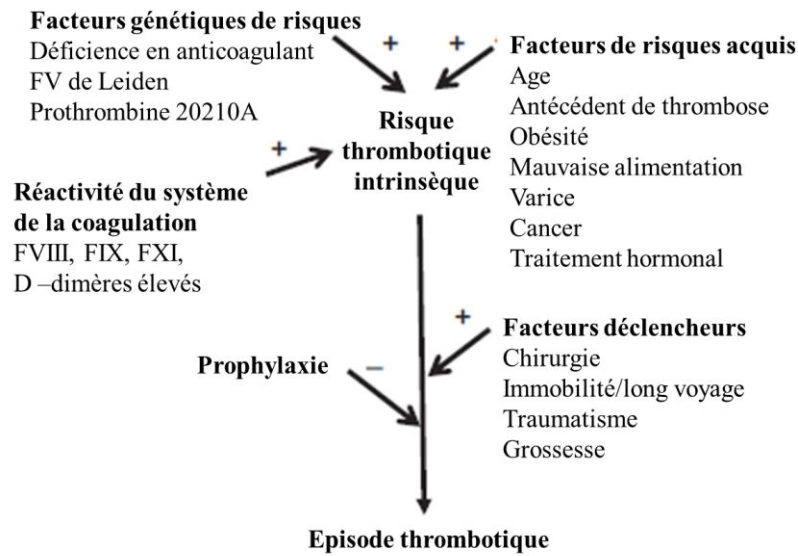
Le vieillissement est très étroitement lié aux pathologies impliquant l'endothélium et aboutissant à des événements cardiovasculaires et thromboemboliques (**Figure 29**). L'incidence des thromboses veineuses est de 1 pour 10 000 par an dans une population de 25 à 30 ans tandis qu'elle atteint 8 pour 1000 par an à 85 ans. Une très forte augmentation de l'incidence des thromboses veineuses profondes et des embolies pulmonaires est observée après 60 ans, 60 % de tous les événements de thrombose veineuse ayant lieu après 70 ans<sup>222</sup>.



**Figure 29 :** Incidence de la première thrombose veineuse en fonction de l'âge et du sexe (d'après Engbers et coll., 2010<sup>223</sup>, adapté de Naess et coll., 2007)<sup>222</sup>.

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) de type ischémique, qui représentent 80 % de tous les AVC, augmentent avec l'âge.

Les altérations aboutissant à des thromboses sont en accord avec le premier postulat énoncé en 1856 par Virchow, aujourd'hui connu sous le nom de Triade de Virchow. Les thromboses veineuses sont décrites comme résultant de la stase du sang, du changement de la capacité du sang à coaguler, et d'altérations de la paroi vasculaire. Les facteurs qui provoquent ces changements peuvent être génétiques, tels que des formes mutées de FV (le FV leiden) et de prothrombine (la prothrombine G20210A), mais également environnementaux. L'épisode thrombotique est alors déclenché par un traumatisme, une chirurgie ou encore après une longue immobilité<sup>224</sup> (**Figure 30**).



**Figure 30 :** Schéma du développement de thromboses veineuses. Le risque intrinsèque est lié à la combinaison entre les facteurs génétiques de risque et environnementaux ainsi que la modulation de la coagulation qui peut empêcher les facteurs déclencheurs d’aboutir à l’apparition d’une thrombose (d’après Cushman., 2007)<sup>224</sup>.

L’immobilité, le cancer, ou encore certaines maladies, telles que le diabète, sont toutes liées à une augmentation du risque thrombotique, tous ces facteurs de risque augmentant avec l’âge<sup>225-229</sup>. En ce qui concerne la coagulation, l’augmentation des FVIII, FIX, FXI, du vWF, de la prothrombine, du fibrinogène et des D-dimères circulants est associée à une forte augmentation du risque de thrombose<sup>230-232</sup>.

Les concentrations en FVIII, FVII, fibrinogène ou encore D-dimères sont modifiées avec le vieillissement<sup>230,233</sup>. Bien que l’implication du fibrinogène dans le risque de thrombose veineuse soit claire<sup>234</sup>, son implication dans l’augmentation du risque de thrombose avec le vieillissement est encore sujet à discussion<sup>235,236</sup>. Le FVIII et le vWF ont tous deux été associés à l’augmentation de ce risque avec l’âge<sup>233</sup>. Au niveau de la fibrinolyse, le PAI-1 serait impliqué dans l’augmentation du risque de thrombose associé au vieillissement<sup>124</sup>.

Les facteurs de risque présents préférentiellement chez des personnes âgées regroupent plusieurs éléments. Une diminution des capacités musculaires va affecter les capacités de retour du sang veineux au niveau des membres inférieurs et de ce fait augmenter la stase sanguine<sup>237,238</sup>. Cette

stase pourra également être causée par une insuffisance veineuse provoquée par une altération des valves veineuses suite à un remodelage de la paroi veineuse ou des valves elles-mêmes<sup>239,240</sup>.

La dysfonction endothéliale, qui est associée au risque d'évènements cardiovasculaires, est très associée au vieillissement<sup>241</sup>. Le vieillissement et le remodelage des veines et des artères avec l'augmentation de la proportion de fibres de collagène participent au développement de la dysfonction endothéliale<sup>242</sup>. Les capacités anticoagulantes de l'endothélium sont également diminuées avec l'âge<sup>243</sup>. La stase veineuse peut également diminuer la diffusion des facteurs anticoagulants et donc altérer leur action<sup>244</sup>.

D'autres facteurs liés à l'âge, tels que la fragilité ou encore le placement en établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes, sont également corrélés au risque de thrombose<sup>245,246</sup>.

## **II.7. L'insuffisance cardiaque (IC)**

### **II.7.1. Définition de l'IC**

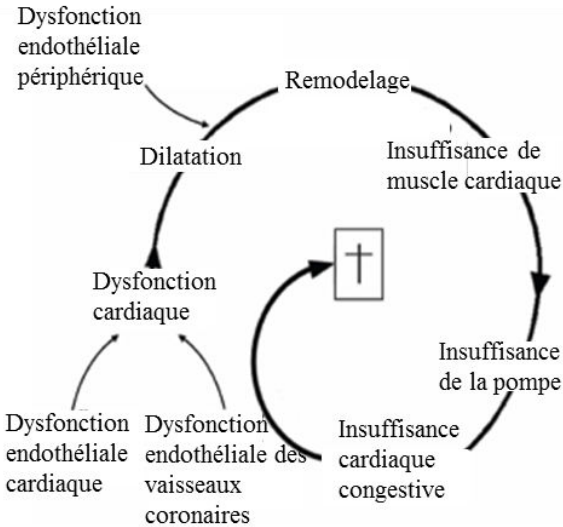
L'IC se caractérise par une incapacité du myocarde à assurer un débit cardiaque suffisant pour irriguer l'organisme<sup>247</sup>. Cette défaillance du muscle cardiaque correspond à un dysfonctionnement au niveau de la contraction des ventricules droit ou gauche, ou même des deux simultanément. Le débit cardiaque va dépendre de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique (qui correspond à la différence entre les volumes diastolique et systoliques). Le paramètre qui découle du volume d'éjection systolique est la fraction d'éjection qui est le pourcentage de volume éjecté entre les volumes systolique (VS) et diastolique et (VD) :  $(VD - VE)/VD$ . Chez un individu sain la fraction d'éjection est supérieure à 60 %. L'IC peut être d'origine vasculaire, résultant d'une rigidité artérielle et d'une hypertension.

La mise en place de l'IC est présentée de plusieurs manières (**Figure 31**). Cela peut être un cercle vicieux qui matérialise l'aspect progressif, pernicieux et irréversible de la maladie provoquée par une dysfonction de l'endothélium consécutive à d'autres pathologies (diabète, hypertension...). Le paradigme temporel montre une IC progressive et met l'accent sur une succession de stades aggravants la maladie. Une altération de la capacité musculaire du ventricule aboutit à une

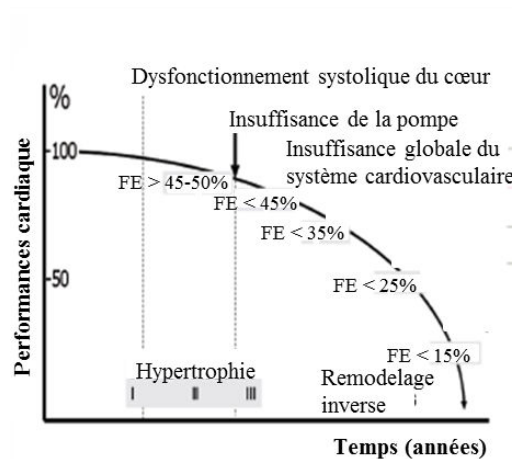


dégradation globale de la fonction cardiaque. La dernière représentation est une représentation en éventail qui insiste sur le fait que chaque IC est différente avec une mise en place et une aggravation dépendante de l'histoire du patient<sup>248</sup>.

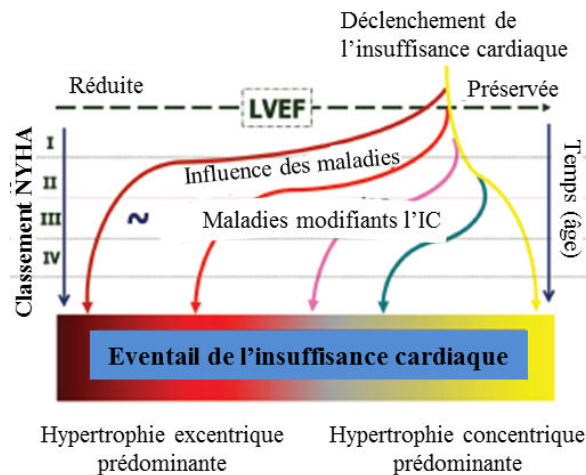
Le paradigme en cercle vicieux de l'IC



Le paradigme en ligne temporelle de l'IC



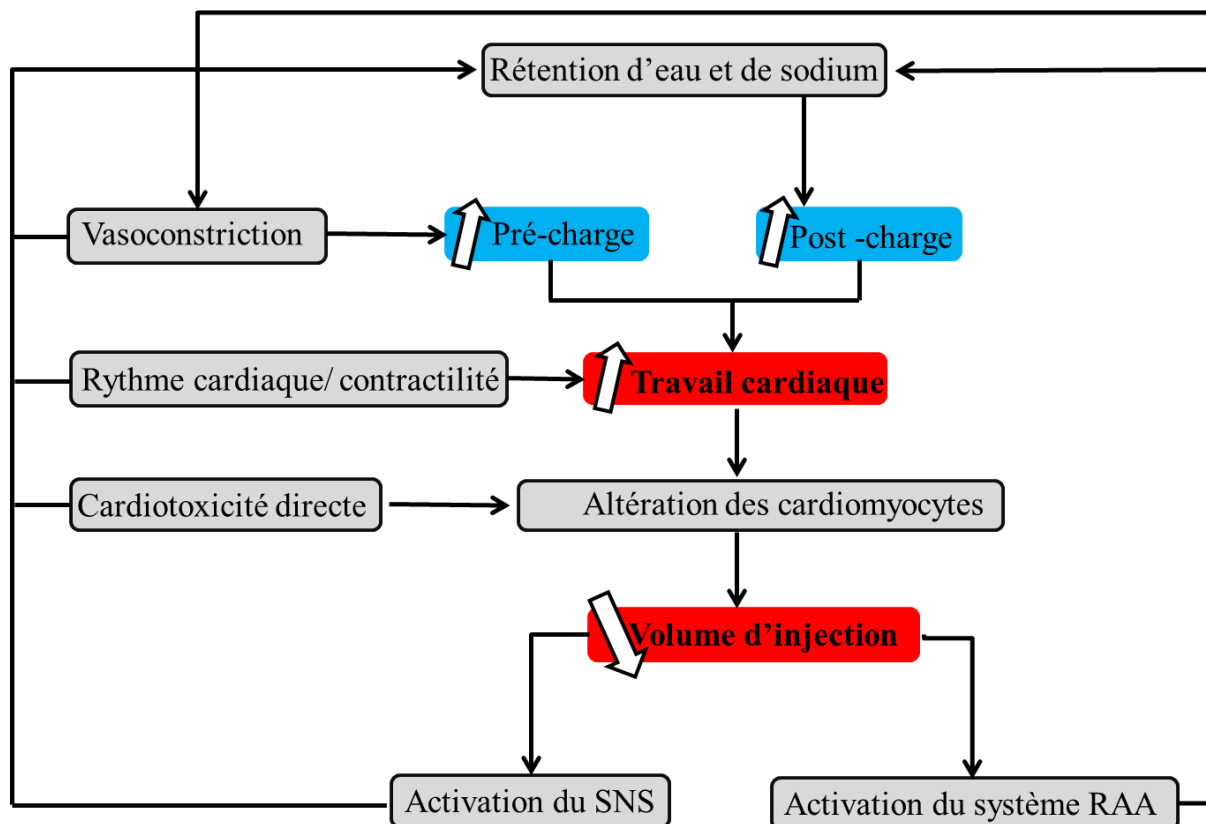
Le paradigme en éventail de l'IC



**Figure 31 :** Les différents paradigmes de la progression de l'insuffisance cardiaque. IC : insuffisance cardiaque ; FE : fraction d'éjection ; LVEF : fraction d'éjection du ventricule gauche ; NYHA : New York Heart Association (d'après De Keulenaer et coll., 2011<sup>248</sup>).

## Le cercle vicieux du système RAA

L'IC débute par une diminution de l'irrigation des organes et une redistribution du flux sanguin pour tenter d'irriguer au mieux les principaux organes (cerveau, cœur, rein). La redistribution est possible par le biais d'une vasoconstriction des artères de résistance. Cette tentative d'adaptation va pourtant provoquer une diminution de la perfusion des reins qui eux vont réguler la volémie par l'intermédiaire de l'activation du système RAA se traduisant par une rétention hydrosodée (**Figure 32**). Plus le volume sanguin est important plus le remplissage ventriculaire sera augmenté, aggravant secondairement le remodelage cardiaque intervenant dans l'IC. Le système RAA provoque également une vasoconstriction pour augmenter la pression et théoriquement le débit rénal, ce qui a pour effet d'augmenter les résistances périphériques<sup>249</sup>.



**Figure 32 :** Altération de la fonction cardiaque lors de la mise en place d'une insuffisance cardiaque. SNS : système nerveux sympathique ; système RAA : système rénine-angiotensine-aldostérone.

## Classement de la gravité des IC

La NYHA (l'association du cœur de New York) a classé l'IC en 4 grandes catégories basées sur la capacité physique des patients et leurs symptômes (**Tableau 3**).

Classification de la NYHA	
<b>Classe I</b>	Patient porteur d'une cardiopathie mais sans aucune réduction de l'activité physique.
<b>Classe II</b>	Légère limitation de l'activité physique. Aucune gêne au repos mais l'activité quotidienne ordinaire entraîne une fatigue, une dyspnée ou des palpitations.
<b>Classe III</b>	Limitation marquée des activités physiques. Il n'y a pas de gêne au repos mais une activité moins importante qu'à l'accoutumée provoque des symptômes.
<b>Classe IV</b>	Impossibilité de poursuivre une activité sans gêne : les symptômes de l'insuffisance cardiaque sont présents, même au repos, et la gêne est accrue par toute activité physique.

**Tableau 3 :** Classification des 4 stades de l'IC selon la NYHA (New York Heart Association) (d'après Baudet et coll., 2007)<sup>250</sup>.

### II.7.2. L'impact de l'IC sur l'hémostase

L'IC est couramment associée avec une augmentation du risque de thrombose et d'infarctus<sup>251</sup>. Les études portant plus particulièrement sur la dysfonction du ventricule gauche (SOLVD et V-HeFT) ont montré une augmentation du risque d'infarctus chez les patients présentant une IC modérée<sup>252,253</sup>. Le risque d'infarctus augmente avec la gravité de l'IC. Cependant dans l'étude V-HeFT le risque thromboembolique n'était que peu associé au niveau de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG). A l'inverse, une étude de 1997 (SAVE) a reporté une relation inverse entre le risque d'infarctus et la fonction ventriculaire, avec une augmentation de 18 % du risque d'infarctus pour chaque diminution de 5 % de la FEVG<sup>254</sup>. Dans toutes les études à grande échelle portant sur l'IC le risque de thrombose est regardé comme étant d'importance secondaire. Or depuis une quinzaine d'années le concept selon lequel l'IC modifierait les différents aspects

de la triade de Virchow et altérerait l'hémostase à vu le jour<sup>255</sup>. En effet, le manque de contractilité associé à une dilatation du volume des chambres cardiaques modifie le flux sanguin et provoque une augmentation de la stase, stase qui est liée à la formation de thrombus anarchiques. Un pourcentage de 14 à 68 % des patients présentant un anévrisme au niveau du ventricule gauche présentent, post mortem, des signes de thromboses<sup>251</sup>.

La présence d'une dysfonction endothéliale dans le cadre de l'IC est bien documentée<sup>256,257</sup>. Le vWF est lui aussi augmenté chez les patients présentant une IC témoignant d'une activation de l'endothélium<sup>258,259</sup>. En plus de la dégradation au niveau de la capacité à relarguer du NO qui peut provoquer et aggraver l'IC en augmentant la vasoconstriction périphérique, la diminution du NO participe également à l'adhérence des monocytes et plaquettes prédisposant ainsi aux thromboses et embolies.

Enfin le dernier point de la triade concerne la modification des composants sanguins, à la fois les cellules, et les facteurs de la coagulation. Tous sont trouvés modifiés dans l'IC<sup>260,261</sup>.

Plusieurs études randomisées ont montré l'importance d'ajouter un traitement anti-thrombotique chez des patients atteints d'IC (**Tableau 4**)<sup>261-264</sup>. Quatre de ces études ont actuellement été publiées. L'étude HELAS « Heart Failure Long-Term Antithrombotic Study », l'étude WASH « Warfarin Aspirin Study in Heart Failure » et l'étude WATCH « Warfarin and Antiplatelet Therapy in Chronic Heart Failure » n'ont pas permis de montrer de résultats robustes faute d'un nombre de patients suffisant. L'étude WARCEF « Warfarin versus Aspirin in Reduced Cardiac Ejection Fraction », la plus récente, a montré chez des patients avec une FEVG inférieure à 35 %, traités avec de la warfarine ou de l'aspirine<sup>265</sup>. Bien que le risque de décès ne soit pas modifié, le nombre de poussée d'IC ischémiques est diminué chez les patients traités avec de la warfarine.

Des études rétrospectives ont, quant à elles, montrées chez des patients avec diminution de la FEVG un effet bénéfique d'un traitement anticoagulant, mais la diminution du risque imputé à la warfarine ou à l'aspirine n'a cependant pas été observée dans toutes les études<sup>254,266,267</sup>.

Un inhibiteur de la thrombine permet de réduire le risque de mortalité chez des patients avec une FEVG inférieure à 35 % par rapport à des patients traités avec de l'héparine et un inhibiteur de la GpIIb/IIIa<sup>268</sup>.

Le Clopidogrel, qui inhibe les récepteurs à l'ADP plaquettaire, est également associé avec une diminution de la mortalité chez des patients présentant une IC<sup>269</sup>.

En ce qui concerne la thrombine, plusieurs de ses effets cellulaires pourraient avoir une répercussion dans l'IC. En effet les récepteurs à la thrombine sont exprimés au niveau des cardiomyocytes où elle provoque différentes réponses :

- une augmentation de l'influx sodique<sup>270</sup>.
- une augmentation de la production de peptide natriurétique et de l'hypertrophie<sup>271</sup>.
- une augmentation de la mort dans un modèle d'ischémie/reperfusion<sup>272</sup>.
- une inhibition du clivage de PAR-1, la transactivation par MMP-13 et l'aggravation de la dysfonction des myocytes qu'elle provoque<sup>273</sup>.
- une augmentation de la mort cellulaire via PAR-1<sup>272</sup>.

Cette dernière caractéristique pourrait être liée à la mise en place d'arythmies et participer aux ischémies. La thrombine pourrait ainsi jouer un rôle important dans l'IC et inhiber ses effets cellulaires pourrait avoir un effet cardio-protecteur.

Etude	Population	N	Durée du suivi	Résultats
<b>Etudes prospectives</b>				
HELAS <sup>264</sup> , Aspirine vs warfarine	IC (NYHA II-IV)	197	18,5 à 21,9 mois	Pas de différences du fait du faible nombre de patients
WASH <sup>262</sup> , Aspirine vs warfarin vs pas de traitement	IC, FEVG < 35 %	279	27 mois	Pas de différences du fait du faible nombre de patients
WATCH <sup>263</sup> Aspirin vs Warfarine vs Clopidogrel	NIHA II-IV, FEVG < 35 %	1587	21 mois	Pas de différences
WARCEF <sup>265</sup> warfarin vs Aspirine	NYHA II-IV	2305	3,5 ± 1,8 ans	Pas de différences
<b>Analyses post-hoc</b>				
SOLVD <sup>266</sup> antiplaquettaire vs pas d'antiplaquettaire	FEVG < 35%	6512	3,5 ans	Diminution de la mortalité avec le traitement antiplaquettaire
SOLVD warfarine vs pas de warfarine	FEVG < 35%	6513	3,5 ans	Diminution de la mortalité avec la warfarine

**Tableau 4 :** Etudes ayant utilisées des traitements antithrombotiques dans l'IC

### **III. MODELES D'ETUDES**

L'utilisation de modèles animaux possédant des pathologies semblables aux pathologies humaines est nécessaire pour permettre d'étudier l'effet de ces maladies sur les cellules et tissus difficiles à obtenir chez l'homme. Les modèles animaux murins présentent également l'avantage de vieillir beaucoup plus rapidement que l'homme, il est donc plus aisé de les étudier longitudinalement par rapport à une cohorte humaine. Les cohortes humaines sont utilisées en amont et en aval des modèles animaux : en amont car les phénotypes observés chez l'homme permettent d'envisager une étude chez l'animal, et en aval lorsque l'étude sur le modèle animal a permis de mettre en évidence un mécanisme qui permet d'adapter la stratégie thérapeutique chez l'homme.

#### **III.1. Les modèles murins de SMet**

Plusieurs souches murines sont utilisées comme modèle de SMet (**tableau 5**). La majorité des modèles d'animaux obèses présentent une résistance à la leptine avec, soit des récepteurs à la leptine non fonctionnels, soit une forme tronquée de la molécule. Cette résistance à la leptine est également observée chez l'homme<sup>274</sup>.

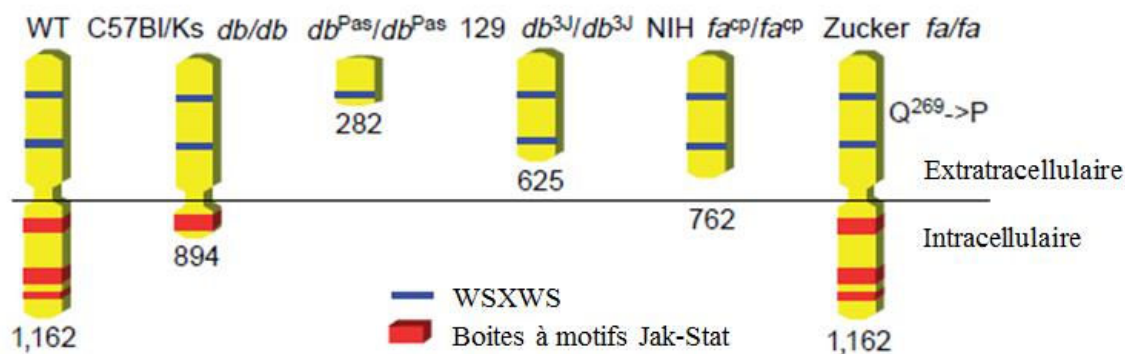
Modèle	Description	Hyperlipidémie	RI	Hypertension	Hypercoagulabilité
<b>Rats</b>					
<b>Zucker</b>	Récepteur à la leptine -/-	oui	oui	oui	Etat prothrombotique
<b>SHR-SP</b>	Hypertension spontanée	non	oui	oui	Lesions hémorragiques, état hypercoagulable
<b>SHR-SP obèse</b>	Hypertension spontanée, Récepteur à la leptine -/-	oui	oui	oui	ND
<b>SHHR</b>	Hypertension spontanée, hyperlipidémie	oui	oui	oui	Hyperfibrinogènie, hypercoagulabilité
<b>Souris</b>					
<b>Lep<sup>ob/ob</sup></b>	déficiencia en leptine	oui	oui	oui	Hypocoagulable
<b>Lep<sup>Rdb/db</sup></b>	Déficiencia en récepteur de la leptine	oui	oui	oui	Moins thrombotique lors de lésions vasculaires
<b>Ldlr-/-Lep<sup>ob/ob</sup> ApoB48-/- Lep<sup>ob/ob</sup></b>	Déficiencia en leptine et en son récepteur	oui	oui	oui	ND
<b>Souris obèses de nouvelles Zeland</b>	Mutation du récepteur à la leptine	oui	oui	oui	ND

**Tableau 5 :** Résumé des différentes anomalies qui caractérisent les rats utilisés comme modèles de l'interaction entre le syndrome métabolique et l'hémostase. SHR-SP : Spontaneously Hypertensive Stroke Prone Rat ; SHHR : spontaneously hypertensive hyperlipidaemic rats ; Lep : leptine; Apo : apolipoprotéine.

### **III.2. Le rat Zucker résistant à la leptine comme modèle de SMet**

Les rats Zucker (fa/fa) présentent les mêmes anomalies métaboliques que celles trouvées chez l'homme et permettant de définir le SMet<sup>275</sup>.

Le rat Zucker est issu d'une mutation spontanée observée pour la première fois par Zucker et Zucker au début des années 1960<sup>276</sup>. Cette mutation récessive est appelée fatty (fa). Elle affecte le gène codant pour le récepteur de la leptine qui va posséder une partie extracellulaire tronquée<sup>277</sup>. Le récepteur tronqué possède néanmoins une faible affinité pour la leptine et est capable de traduire un signal qui sera altéré par rapport au récepteur totalement fonctionnel<sup>278</sup> (**Figure 33**).



**Figure 33 :** Mutation du récepteur à la leptine dans les modèles murins d'obésité (d'après Friedman et Halaas., 1998)<sup>279</sup>.

Les rats Zucker homozygotes (*fa/fa*) développent une hyperphagie après leur troisième semaine de vie<sup>280</sup>, ils deviennent obèses et développent une hyperinsulinémie qui pourra aboutir à une résistance à l'insuline et à une hyperglycémie<sup>281</sup>. L'insulino-résistance résulte d'une forte augmentation de la sécrétion d'insuline, provoquant une augmentation du volume adipeux, suivie, avec le vieillissement, d'une désensibilisation des tissus adipeux et périphériques menant à la résistance à l'insuline<sup>282</sup>.

### III.2.1. La leptine et son récepteur

La leptine est une adipokine principalement sécrétée par les adipocytes. Cette hormone polypeptidique de 167 acides aminés module le volume de la masse adipeuse en agissant au niveau de la prise alimentaire et de la dépense énergétique via l'hypothalamus. Les taux circulants de leptine augmentent en période de jeûne et diminuent en période postprandiale. La leptine augmente également les dépenses énergétiques par la thermogénèse dans le tissu adipeux brun<sup>283-285</sup>. La leptine permet ainsi de réduire le transport de glucose dans les adipocytes. Elle augmente également la glycogénèse et l'oxydation des acides gras au niveau des muscles squelettiques. Ainsi, cette hormone a à la fois un rôle sur le métabolisme du glucose et sur celui des lipides<sup>286</sup>.



### III.2.2.L'impact de la leptine sur l'hémostase

La leptine possède de nombreux rôles au niveau de l'hémostase. Les souris invalidées pour le récepteur de la leptine présentent une augmentation du temps d'occlusion dans un modèle de thrombose aboutissant à un thrombus instable provoqué par des altérations de la fibrinolyse et de la réactivité plaquettaire. Ces altérations peuvent être résorbées par l'administration de leptine<sup>287</sup>. De la même manière l'administration d'un anticorps fonctionnel dirigé contre la leptine augmente le temps d'occlusion après une brèche vasculaire avec ici aussi la formation d'un thrombus instable<sup>288</sup>. Au niveau de agrégation de plaquettes humaine, la leptine combinée à des agonistes plaquettaires habituels, tels que l'ADP ou la thrombine, augmente la réactivité et la capacité d'agrégation des plaquettes. Cette action plaquettaire pourrait être due à la présence de récepteurs à la leptine à la surface des plaquettes<sup>289</sup>. La leptine liée à son récepteur plaquettaire déclencherait la cascade de signalisation impliquant la kinase janus 2 (JAK2), l'inhibiteur de protéases A 3 (PAI3) et la protéine kinase B/Akt aboutissant à une libération de calcium intracellulaire et une activation de la PLC et de la PKC<sup>290</sup>.

### III.3. Le modèle du rat spontanément hypertendu (SHR)

Le rat SHR est le modèle animal le plus couramment utilisé dans la recherche sur l'hypertension. Le rat SHR a été créé par le croisement d'un couple de rat Wistar Kyoto (WKY) non consanguin possédant une PA élevée. Le croisement des rats possédant la plus haute PA de génération en génération a permis de créer la souche de rats consanguins SHR. Les rats SHR deviennent pré-hypertendus entre 6 et 8 semaines avec des PAS à 9 semaines d'environ 135 à 155 mmHg<sup>291</sup>. Ils sont réellement hypertendus à partir de 12 à 14 semaines<sup>292</sup>. Le rat SHR présente, au début de son hypertension, une augmentation du débit cardiaque dans les premiers stades de l'hypertension sans que les résistances périphériques soient augmentées. Une fois l'hypertension installée de manière durable, le débit cardiaque revient à la normale et ce sont les vaisseaux de résistances qui induisent l'hypertension par augmentation des résistances périphériques<sup>293</sup>. L'un des avantages du rat SHR dans la recherche, est qu'il possède cependant la même progression de l'hypertension avec des phases pré-hypertensives et progressives que celles observées chez l'homme<sup>294</sup>.

#### **III.4. La souris surexprimant le RM dans l'endothélium**

Les actions du couple aldostérone/RM intervenant dans d'autres domaines que les régulations homéostatiques sont à ce jour loin d'être complètement comprises. Dans le but d'en apprendre plus sur cette hormone et son récepteur, des modèles de souris surexprimant ou sous-exprimant le RM dans différents tissus ont été générés (**Tableau 6**).

Un modèle de souris surexprimant de manière conditionnelle le RM dans le cœur en absence de modification de l'aldostéronémie présente une augmentation de la mortalité, mortalité pouvant être prévenue par un antagoniste du RM. Il s'avère que cette surmortalité est due à une repolarisation ventriculaire prolongée provoquée par une modification des canaux ioniques en particulier les canaux  $Ca^{2+}$  aboutissant à une arythmie ventriculaire importante<sup>295</sup>. La même équipe a mis au point un modèle de souris qui surexprime le RM humain de manière conditionnelle dans l'endothélium vasculaire.

Ces souris présentent une hypertension modérée (indépendante de l'effet de l'aldostérone sur le rein) sans remodelage vasculaire ni atteinte de la fonction de relaxation de l'endothélium, mais avec une augmentation de la réponse aux vasoconstricteurs<sup>160</sup>.

Mutation	Phénotype	Référence
Invalidation du RM	Mort entre 8 et 12 jours par défaut de réabsorption de sodium	Bleich et coll <sup>296</sup>
Surexpression conditionnelle du RM dans les cardiomyocytes	Un traitement à l'aldostérone modifie l'expression de 265 gènes. Le facteur de croissance des tissus conjonctifs (CTGF), dont l'expression est augmentée, est lié au risque d'infarctus	Messaoudi et coll <sup>297</sup>
	Dysfonction des cellules endothéliales de vaisseaux coronaires	Favre et coll <sup>298</sup>
	Déclenchement d'arythmies	Ouvrard-Pascaud et coll <sup>295</sup>
Surexpression conditionnelle du RM dans les cellules souches de cardiomyocyte	Augmentation du rythme cardiaque et des arythmies	Le Menuet et coll <sup>299</sup>
Invalidation conditionnelle du RM dans les myocytes	Préservation de la fonction cardiaque après surcharge volémique	Lother et coll <sup>300</sup>
	Meilleure récupération suite à un infarctus	Fraccarollo et coll <sup>301</sup>
Surexpression conditionnelle du RM dans les cellules endothéliales vasculaires	Augmentation de la pression artérielle indépendamment du rein et liée à l'augmentation de l'endothéline	Nguyen et coll <sup>160</sup>

**Tableau 6 :** Modèles de souris transgéniques pour le récepteur minéralocorticoïde au niveau cardiovasculaire et leurs phénotypes.

### **III.5. Les cohortes de patients atteints d'IC traitées avec un antagoniste du RM**

Plusieurs études à grande échelle ont porté sur le rôle des bloqueurs du MR chez des patients ayant eu un évènement cardio-vasculaire.

En 1999, Pitt et coll ont montré que l'ajout de spironolactone au traitement de patients ayant présentés un épisode grave de pathologie cardiaque diminuait de 30 % les risques de décès dans les 36 mois<sup>136</sup>. De la même manière l'étude EPHEBUS portant sur des patients ayant une dysfonction du ventricule gauche suite à un infarctus du myocarde a montré une diminution de 21 % de la mortalité suite à l'administration d'éplérenone<sup>137</sup>. L'étude la plus récente de l'action d'un antagoniste du RM dans une population de patients traités suite à une crise cardiaque et présentant une dysfonction systolique du ventricule gauche avec des fractions d'éjections inférieures à 35 % est l'étude EMPHASIS-HF. Dans cette étude, un antagoniste présentant une meilleure affinité que la spironolactone pour le RM, l'éplérenone, a été utilisé. Une diminution de 24 % de la mortalité est observée chez ces sujets<sup>138</sup>.

#### **IV. HYPOTHESES ET OBJECTIFS**

Nous faisons l'hypothèse que les modifications qui interviennent au niveau structural et cellulaire de la paroi artérielle dans le SMet, l'hypertension et l'IC entraînent des anomalies de l'hémostase qui aggravent ces tableaux cliniques.

L'objectif de ce travail est de caractériser l'état et les altérations de l'hémostase en fonction d'anomalies métaboliques et de pression impliquées dans l'évolution vers l'insuffisance cardiaque.

Le SMet se caractérise par une obésité, une dyslipidémie, une hypertension ou encore la mise en place d'un diabète de type 2. Tous ces symptômes augmentent fortement le risque cardiovasculaire et sont chacun associés avec des dérégulations de l'hémostase.

L'hypertension est due à une dérégulation du maintien de la volémie, du tonus vasculaire et du débit cardiaque caractérisant le SMet. C'est également l'un des facteurs du développement d'une IC.

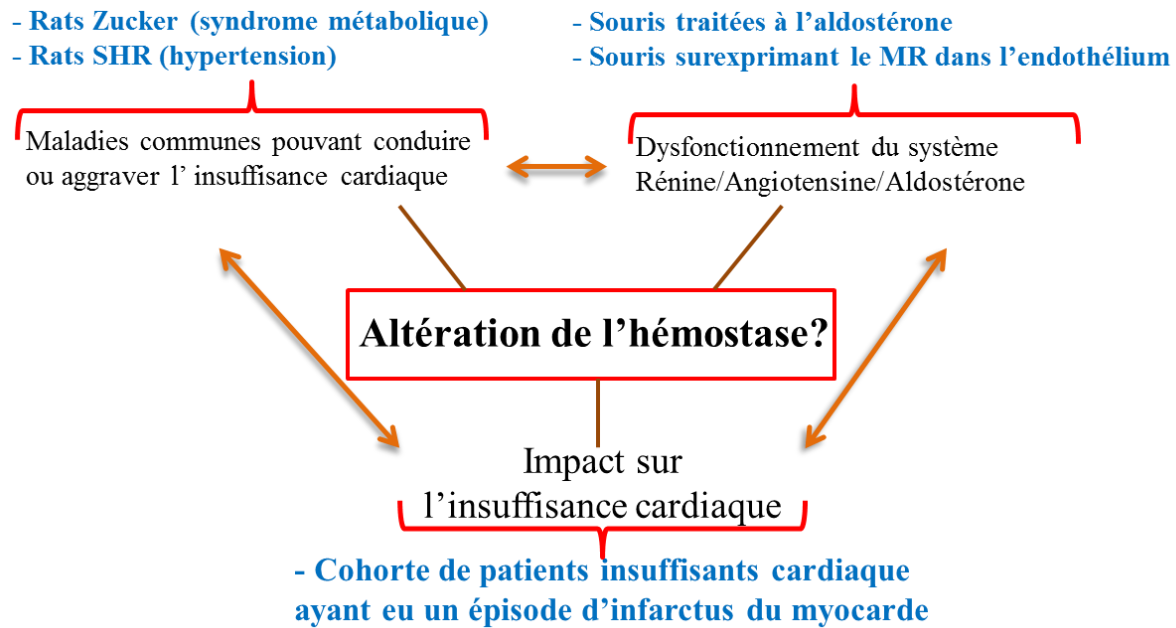
L'IC est une pathologie fréquente qui touche de 3 à 20 personnes pour 1000 par an et plus de 50 pour 1000 par an pour les personnes de plus de 80 ans, et dont les chances de survie à 1 an ne sont que de 65 %. Cette maladie cardiovasculaire est caractérisée par un cercle vicieux entre les capacités cardiaques, la régulation de la volémie et la fibrose, par le système de l'aldostérone, aboutissant à une diminution des apports en oxygène aux organes. La diminution de l'espérance de vie dans l'IC est l'un des problèmes majeurs de santé publique.

Les altérations de l'hémostase font partie des pathologies cardiovasculaires et leurs implications dans la physiopathologie de l'IC commencent à être étudiées. La paroi vasculaire et particulièrement l'endothélium, de par ses propriétés anticoagulantes, jouent un rôle primordial dans les pathologies thrombotiques. L'une des problématiques est donc de comprendre les mécanismes qui entrent en jeu dans la dysfonction de l'hémostase et de la paroi vasculaire, pour pouvoir envisager des stratégies de traitements des anomalies de l'hémostase dans ces pathologies.

## V. STRATEGIES D'ETUDE

Pour explorer les liens existant entre l'hémostase et les pathologies liées à la mise en place d'une IC nous avons séparé notre étude en trois parties (**Figure 34**) :

- Dans un premier temps nous avons utilisé un modèle de rat (le rat Zucker) développant les mêmes anomalies que le SMet humain (obésité, hypertension, dyslipidémie, intolérance au glucose) et avons suivi les différentes phases de l'hémostase (agrégation plaquettaire, coagulation et fibrinolyse) à la fois chez le rat adulte (25 semaines) et le rat âgé (80 semaines). Pour étudier le rôle spécifique de l'hypertension nous avons également utilisé des rats SHR de 12 semaines, qui sont naturellement hypertendus.
- Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à l'effet de l'activation du système RAA sur l'hémostase puisqu'une dérégulation de ce système participe à la mise en place d'une IC. Nous avons traité des souris à l'aldostérone et caractérisé leur hémostase. Nous avons également utilisé des souris surexprimant le RM dans l'endothélium puisque l'aldostérone peut agir directement sur le vaisseau sanguin dans la mesure où son récepteur est présent sur les CE.
- Enfin nous avons étudié les relations entre la rigidité et la pression sanguine dans une cohorte de patients insuffisants cardiaques traités avec un antagoniste du récepteur à l'aldostérone. Nous engageons un phénotype plus poussé de leur hémostase pour explorer des modifications de la balance hémostatique dans ce contexte pathologique caractérisé par des ischémies thrombotiques. Nous avons aussi voulu savoir si la modulation du système RAA pouvait avoir également un impact sur la survenue de ces thromboses.



**Figure 34 :** Schéma de la stratégie d'étude.

## **VI. MATERIELS ET METHODES**

### **VI.1. Les animaux**

#### **VI.1.1. Les rats Zucker**

Les rats utilisés sont des rats Zucker élevés à l'animalerie de la faculté de médecine de Nancy. La souche de rats Zucker utilisée présente une hyperphagie, une hypertriglycéridémie, une hyperleptinémie et une hyperinsulinémie et descend de la souche utilisée dans une étude précédente<sup>302</sup>. Quatre groupes de rats ont été utilisés : des rats témoins non obèses (FA/FA) ou (FA/fa), avec un groupe de rats de 25 semaines, et un autre de 80 semaines, et deux groupes de rats obèses (fa/fa) également de 25 ou 80 semaines.

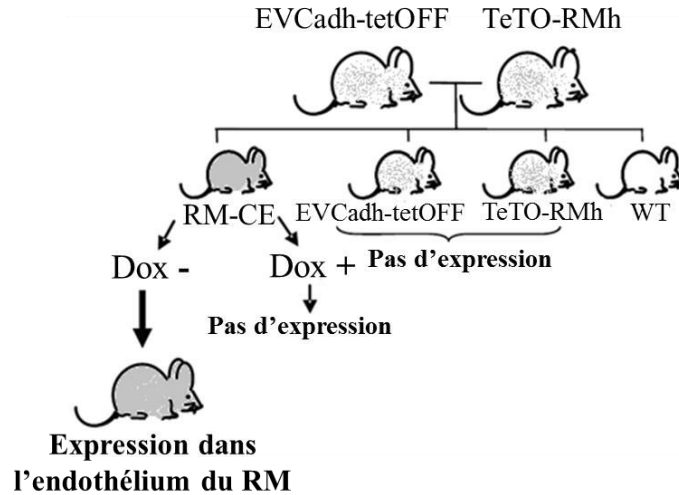
#### **VI.1.2. Les rats SHR**

Les rats SHR d'Okamoto et les rats Wistar ont été obtenus de l'élevage des laboratoires Charles River et de Janvier. Des rats de 5 semaines pré-hypertendus et de 12 semaines hypertendus ont été utilisés.

#### **VI.1.3. Les souris RM-CE et les souris traitées à l'aldostérone**

Les souris surexprimant de manière conditionnelle le RM humain dans l'endothélium ont été obtenues par collaboration avec l'INSERM U872 de Paris. Elles sont créées par croisement entre des souris monotransgéniques tetO-hMR et monotransgéniques possédant le transactivateur endothélium-vasculaire-cadhérine-tetOFF. Les souris endothélium-vasculaire-cadhérine-tetOFF, tetO-hMR et sauvage FVB/NRj sont utilisées comme contrôles (**Figure 35**).





**Figure 35 :** Génération de souris surexprimant de manière conditionnelle le RM humain dans l'endothélium. Des souris portant le système de localisation EVCadh-tetOFF sont croisées avec des souris portant le gène humain pour le RM. Les souris double transgénique obtenues synthétisent, au niveau de l'endothélium, le RM humain. Cette expression de RM peut être réprimée par l'administration de doxycycline (1 mg/ml dans l'eau de boisson).

Des souris sauvages FVB/NRj ont également été traitées à l'aldostérone (60 µg/kg/jour pendant 21 jours) par minipompes osmotiques. Des souris de 3 à 7 mois ont été utilisées dans les différentes expériences. Les expériences ont été réalisées conformément aux recommandations de la communauté européenne (directives 86/609/CEE) et du comité d'éthique de l'INSERM

## **VI.2. Les patients de l'étude EPHEBUS**

L'étude EPHEBUS repose sur une cohorte de patients insuffisants cardiaques ayant eu un infarctus du myocarde compliqué par une insuffisance systolique du ventricule gauche (fraction d'éjection  $\leq 40\%$  par échographie ou angiographie). Les patients sont définis comme insuffisants cardiaques s'ils présentent des râles pulmonaires, une radio du thorax montrant une congestion veineuse, ou un souffle cardiaque. Les patients ont été inclus dans l'étude à tous les stades de l'IC dans les 3 à 14 jours qui ont suivi l'infarctus. Les patients diabétiques pouvaient être inclus sans avoir une IC avérée. Les patients ont ensuite reçu, en double aveugle et pendant un mois, un traitement à l'éplérenone de 25 mg par jour ou un placebo. Par la suite, le traitement a pu être augmenté à 50 mg par jour (ou placebo) en fonction du taux de potassium des patients. Le traitement à l'éplérenone a été donné en plus du traitement standard comprenant des inhibiteurs

de l'enzyme de conversion de l'angotensine ou des antagonistes du récepteur de l'angiotensine (IECA, ARA), des bêta-bloquants, des diurétiques, de l'aspirine, des statines, ou encore une thérapie de reperfusion coronaire. La durée moyenne du suivi des patients a été de 16 mois.

Sur les 6632 patients de l'étude, 19 ont dû être exclus de l'analyse par absence de données sur leur pression sanguine basale. Les patients considérés comme normotendus étaient ceux sans antécédent d'hypertension et avec une PAS < 140 mmHg et PAD < 90 mmHg. Les autres patients, avec ou sans traitement à l'éplérenone, ont été placés dans le groupe « hypertendus ». Trois cent six patients ont également eu une mesure de leur VOP en utilisant un appareil Complior (Alam Medical, Vincennes, France).

### **VI.3. Les prélèvements**

#### **VI.3.1. La Préparation du plasma dépourvu de plaquettes (PDP)**

Les animaux non à jeun sont anesthésiés à l'isoflurane, 3 % pour les rats et 4 % pour les souris avec un débit d'oxygène de 1,5 l/min. Le sang est prélevé par pose d'un cathéter à la carotide pour le rat et par écoulement libre avec section de la carotide pour les souris, et anticoagulé à raison de 9 volumes de sang pour 1 volume de citrate de sodium. Pour certains tests, le sang a été anticoagulé avec de l'acide citrate dextrose (ACD) (85 mM  $C_6H_5Na_3O_7$ , 66,6 mM  $C_6H_8O_7$ , 111 mM  $C_6H_{12}O_6$ ) (à raison de 9 volumes de sang pour 1 volume d'anticoagulant), ou à l'EDTA avec des tubes Vacutainer®. Le sang est ensuite centrifugé à 190 g pendant 10 min puis à 1 750 g à température ambiante. Le surnageant est ensuite centrifugé à 13 000 g pendant 30 min à 4 °C. Le plasma dépourvu de plaquettes (PDP) ainsi obtenu est conservé à -80 °C.

#### **VI.3.2. La préparation du plasma riche en plaquettes (PRP)**

Le PRP est préparé à partir de sang total anticoagulé au citrate pour les expériences de thrombinographie et anticoagulé à l'ACD pour les expériences d'agrégation plaquettaire. Le sang total a été centrifugé 4 min à 190 g puis 1 min 30 s à 1 900 g à température ambiante. Le surnageant a ensuite été récupéré et la numération plaquettaire réalisée à l'aide d'un compteur

Micro 60 ABX (Montpellier, France). L'ajustement à la concentration plaquettaire voulue est fait en centrifugeant à nouveau le culot restant à 1 750 g pendant 10 min à température ambiante, le surnageant pauvre en plaquettes obtenu est utilisé pour cet ajustement.

### **VI.3.3. Les prélèvements de tissus et d'organes**

Les animaux sont mis à mort par exsanguination. L'aorte, le cœur, ainsi que la carotide, intacts, sont ensuite prélevés et dégraissés sur glace dans du sérum physiologique. Ils sont ensuite conservés à -80 °C. Dans le cadre des expériences sur les rats SHR, des anneaux aortiques de 2 mm ont été préparés sous loupe binoculaire après avoir dégraissé l'artère. Les anneaux sont ensuite lavés en PBS (Phosphate buffered saline, Dulbecco's, sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ) pendant 1 h avant d'être utilisés en thrombinographie.

## **VI.4. Le phénotypage de l'hémostase**

### **VI.4.1. L'évaluation de la réactivité plaquettaire**

#### **VI.4.1.1. Agrégation plaquettaire**

L'agrégation plaquettaire a été étudiée avec du PRP ou des plaquettes lavées. Pour la préparation de plaquettes lavées le PRP est centrifugé 4 min à 1 000 g, le surnageant est ensuite retiré et le plasma restant sur les parois du tube est absorbé avec un coton. Les plaquettes sont ensuite très doucement resuspendues avec du tampon Tyrode-BSA (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{NaHCO}_3$  12 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,4 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, Hépès 5 mM, glucose 5,5 mM, albumine 0,35 %, pH 7,3) à l'aide d'une pipette de 1 ml. Un comptage est effectué pour pouvoir ajuster la numération plaquettaire à la valeur choisie.

L'agrégation plaquettaire permet de quantifier l'agrégation des plaquettes en mesurant la transmission de lumière à travers du PRP ou des plaquettes en suspension dans un tampon. La transmission de lumière est réglée à 100 % avec du PDP (ou du tampon Tyrode-BSA) et à 0 % avec le PRP non activé ou des plaquettes lavées. La transmission de lumière augmente au fur et à

mesure que les plaquettes forment des agrégats et les résultats sont exprimés en pourcentage d'agrégation. L'amplitude et la vitesse de cette augmentation dépendent essentiellement de la réactivité des plaquettes. La transmission de lumière est mesurée en continu au moyen d'un agrégomètre (SD Medical, Frouard). La mesure de l'agrégation plaquettaire a été réalisée dans des cuves à 37 °C contenant chacune 300 µl de PRP ou de plaquettes lavées. Deux agonistes ont été utilisés, le collagène à 10 µg/ml et l'ADP à 10 µM (SD Medical, Frouard). L'agrégation est suivie pendant 10 min. Un logiciel spécialisé permet de calculer les paramètres d'agrégation (pourcentage d'agrégation à différents temps, pourcentage d'agrégation maximale, pente de la courbe, aire sous la courbe à différents temps). Seul le pourcentage d'agrégation maximal sera présenté dans les résultats dans la mesure où il est représentatif des autres paramètres.

#### **VI.4.1.2. Les dosages des sécrétions plaquettaires**

Après 10 min d'agrégation plaquettaire, 30 µl d'EDTA (16 mM) froid sont ajoutés dans chaque cuve d'agrégation. Le PRP ou les plaquettes lavées sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 2 min à 20 °C. Le surnageant est alors prélevé et congelé à -80 °C. La sécrétion des granules denses est évaluée en mesurant l'ATP relargué à l'aide du kit ATP détermination (Invitrogen).

Les taux de thromboxane B2 (TXB2), le métabolite stable du TXA2, sont déterminés dans le sérum qui est préparé à partir de sang total non anti-coagulé incubé 2 h à 37 °C, puis une nuit à 4 °C. Les taux sériques de TXB2 ont été déterminés avec le kit Thromboxane B2 Express EIA kit-Monoclonal (Cayman Chemical) en suivant les recommandations du fabricant.

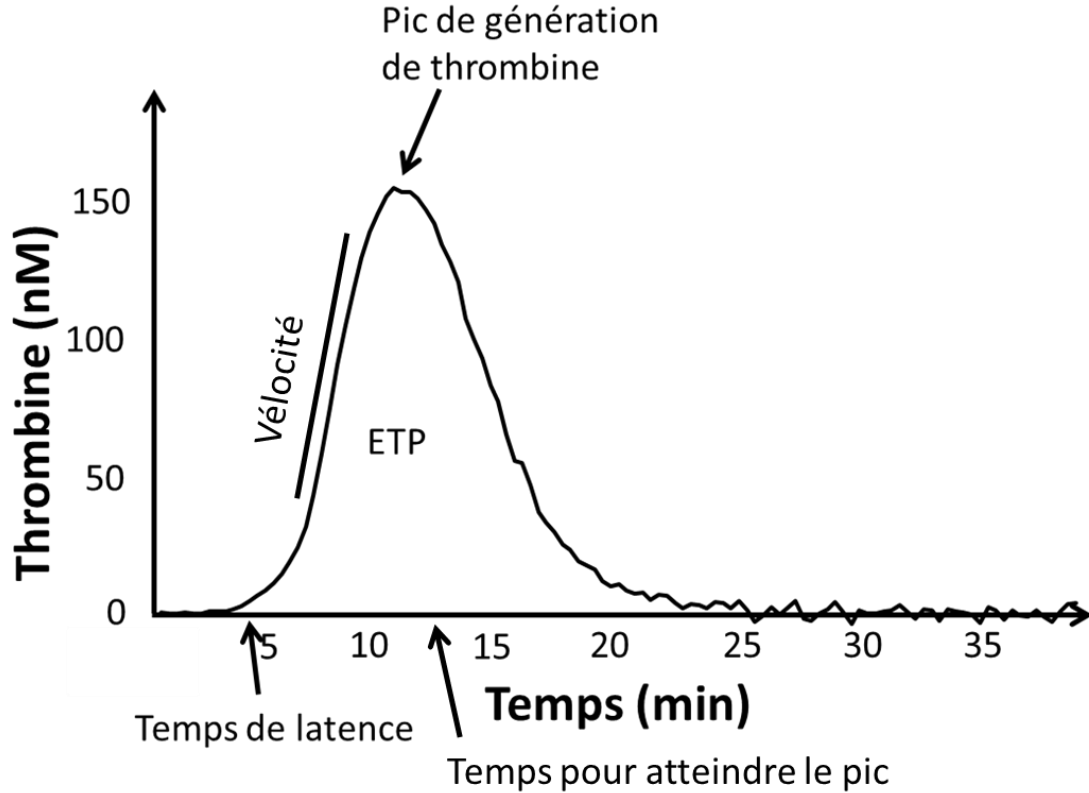
#### **VI.4.2. La génération de thrombine en plasma ou à la surface de cellules**

La mesure de la génération de thrombine est une technique qui consiste à mesurer, dans un plasma recalcifié, la thrombine générée au cours du temps par l'intermédiaire d'un substrat fluorigène. Le suivi de la génération de thrombine est réalisé dans le fluorimètre Fluoroskan Ascent (Labsystems) avec le logiciel dédié Thrombinoscope® version 3.1.0.55 (Synapse, Maastricht, Pays-Bas). Un substrat fluorigène de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem) est utilisé. La fluorescence est enregistrée avec une longueur d'onde d'excitation à 390 nm, une

longueur d'onde d'émission à 460 nm et un intervalle de mesure de 15 s. Un calibrant (mélange d'un complexe  $\alpha_2$ -macroglobuline/thrombine humaine ajusté à une activité connue d'environ 600 nM avec de l'AT bovine 100 nM et de l'héparine à 2 U/ml) est ajouté sur la plaque pour corriger les effets de consommation du substrat et de filtre interne ainsi que l'influence de facteurs optiques intrinsèques au plasma, de l'appareillage et des consommables. Il permet également le calcul de la quantité de thrombine générée par conversion des unités de fluorescence obtenues en molarité de thrombine active. Les mesures sont réalisées en triple dans des microplaques 96 puits en polypropylène, fond rond (Greiner). La réaction est obtenue en déposant dans les puits 10  $\mu$ L de tampon HBS pH 7,35 constitué d'HEPES (N-[2-hydroxyethyl] pipérazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) 20 mM, de NaCl 140 mM, et de BSA (Sigma ref. A-3912) à 5 g/l, 5  $\mu$ l de VP constituées de Pc/Ps/Pe dans un rapport 60/20/20 moles% à 4  $\mu$ M final et 5  $\mu$ l de FT à une concentration finale de 5 pM (h-rTF, Innovin Dade Behring) puis 80  $\mu$ l de PDP. Un puits contenant 20  $\mu$ l de calibrant (Synapse B.V., Maastricht, Pays-Bas) et 80  $\mu$ l de spécimen plasmatique est inclus dans la plaque pour chaque plasma étudié. La plaque est placée dans le fluorimètre 5 min avant l'addition par cet appareil de 20  $\mu$ l d'un mélange de substrat fluorigène à 2,5 mM en HEPES 20 mM, pH 7,35, contenant de la BSA à 60 g/l et de CaCl<sub>2</sub> 100 mM.

Pour du plasma humain, 80  $\mu$ l de plasma sont utilisés pour un volume réactionnel total de 120  $\mu$ l. Pour diminuer le volume de plasma à utiliser, nous avons diminué par deux les volumes de plasma et de réactif et quantifié la génération de thrombine avec 40  $\mu$ l de plasma pour un volume réactionnel de 60  $\mu$ l.

Plusieurs paramètres caractérisent les courbes de génération de thrombine ou thrombinogramme. Il y a ceux donnés directement par le thrombinogramme, comme le temps de latence, qui est le temps requis pour atteindre la génération explosive de thrombine et correspondant à la formation du caillot, le pic de génération de thrombine et le temps mis pour atteindre ce pic. Le thrombinogramme permet aussi de calculer le potentiel thrombinique (ETP pour « endogenous thrombin potential ») qui est l'aire sous la courbe et qui correspond à la quantité totale de travail enzymatique que la thrombine peut accomplir, et la vélocité qui est la vitesse de génération de thrombine durant la phase explosive (**Figure 36**). Certaines expériences ont été réalisées en ajoutant 60 mM de TM de lapin (American Diagnostica) pour explorer la réactivité du système anticoagulant de la PCa dont l'activation nécessite la présence de TM.



**Figure 36 :** Les paramètres de la génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes sur un pool de 10 plasmas humain. ETP : endogenous thrombin potential.

La thrombinographie en plasma riche en plaquettes (PRP) est réalisée en suivant le même protocole, à la différence près que les VP ne sont pas ajoutées et que le volume correspondant est remplacé par du tampon HBS.

La mesure de génération de thrombine à la surface des cellules est réalisée sans ajout de VP ni de FT. Les cellules, CE ou CML, sont cultivées en plaques 96 puits (MICROTESTTM96) à fond plat (**voir partie V.6.2 Culture cellulaire**). Le milieu de culture est retiré et les puits sont lavés deux fois avec 200  $\mu$ l de PBS à 37 °C par puits. Le milieu réactionnel final est de 20  $\mu$ l d'HBS de 80  $\mu$ l de PDP (ici un pool de PDP humain), et 20  $\mu$ l du mélange de substrat fluorigène 2,5 mM et de CaCl<sub>2</sub> 100 mM.

Les thrombinographies en présence d'anneaux aortiques sont réalisées en déposant un anneau par puits dans une plaque 96 puits en polypropylène à fond rond (Greiner), avec 80  $\mu$ l d'un pool de PDP sans TF et sans VP.

### VI.4.3. Les dosages

#### VI.4.3.1. Les dosages par test ELISA

Chacun des dosages suivant a été réalisé selon les instructions du fournisseur. Les différentes trousse utilisées sont :

- Pour le dosage des fragments F1+2, la trousse de dosage Enzygnost\_F1+2 (Siemens, Deerfield, USA).
- La trousse Actichrome® TF (American Diagnostica, Stamford, USA) pour le dosage du FT.
- La trousse Enzygnost TAT micro (Dade Behring, Marburg, Allemagne) pour le dosage des complexes TAT.
- Le coffret ACTICHROM TFPI Activity Assay (American Diagnostica) pour le dosage de l'activité du TFPI. Pour ce dosage les dilutions ont été augmentés à 1/50 en tampon de dilution.
- Une trousse COAMATIC® Antithrombin (CHROMOGENIX, Lexington, USA) pour le dosage de l'AT.
- Le coffret ASSERACHROM VWF® : Ag (Diagnostica Stago, Asnières, France) pour la forme antigénique du vWF.
- Le kit Quantikine® ELISA (R & D Systemes, Abingdon, UK) pour la forme soluble d'ICAM-1.
- Le kit d'USCN Life Science inc (Wuhan, China) pour la TM, en utilisant 10 µg de protéines par puits.
- Le kit ELISA dédié (Cusabio® biotech, Wuhan, China) en utilisant 10 µg de protéines par puits pour la métalloprotéase ADAM17.
- Le kit Asserachrom sEPCR (Diagnostica Stago) pour le dosage de l'EPCR dans les surnageants et les protéines cellulaires.
- Le kit mouse sEPCR ELISA (Elabsciences®, Wuhan, China) pour l'EPCR plasmatique et des cellules aortiques de souris. Les protéines aortiques sont préparées par 3 cycles de congélation-décongélation en PBS ; 2 µg de protéines par puits sont utilisés.

- Le dosage du CD146 soluble a été mis au point au laboratoire. Un volume de 100 µl d'une solution d'anticorps monoclonal de souris anti-CD146 (US Biological, Swampscott, USA) à 1 µg/ml dilué en tampon carbonate-bicarbonate (bicarbonate de sodium 0,09 M, carbonate de sodium 0,01 M, chlorure de sodium 0,5 M) pH 9,6 est déposé dans chaque puits d'une plaque COSTAR « high binding ». Après une nuit à 4 °C, les puits sont lavés 3 fois avec du PBS-Tween (NaCl 131 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,56 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,56 mM, Tween 20 à 0,05 %). La saturation est effectuée en distribuant 125 µl de BSA (Sigma ref. A-3912) à 1 % dans du PBS dans chaque puits. L'incubation doit se faire à 4 °C pendant au moins une nuit. Les spécimens de PDP sont dilués au 1/5 et 1/10 en PBS-Tween, 100 µl de chaque dilution sont déposés dans chaque puits. Le mélange est incubé 2 h à température ambiante. Après 3 lavages avec du PBS-Tween, 100 µl d'anticorps monoclonal de souris anti-CD146, clone 2Q401, marqué à la biotine, à 1 µg/ml en PBS-Tween, sont ajoutés dans chaque puits. Le mélange est incubé 2 h à température ambiante. Après 3 lavages avec du PBS-Tween, 100 µl de streptavidine HRP (Horseradish Peroxidase) (Zymed, San Francisco, USA) au 1/1000 en PBS-Tween, sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée 15 min à température ambiante. Après 3 rinçages avec du PBS-Tween et un lavage avec de l'acétate citrate pH 6 (acétate de sodium 2 M, pH ajusté à 6 avec de l'acide citrique) la coloration se fait avec 100 µl de substrat 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 0,1 mM /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 6 mM par puits et l'arrêt de la coloration par ajout de 50 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1 M. La lecture est effectuée à 450 nm. Les résultats sont exprimés en absorbance à 450 nm car les solutions disponibles calibrées en CD146 humain ne sont pas reconnues par les anticorps utilisés pour le dosage du CD146 de rat.

#### **VI.4.3.2. Le dosage du fibrinogène coagulant**

Ce dosage est réalisé dans un coagulomètre semi-automatique KC 10. Un volume de 200 µl de PDP dilué au 1/10 ou 1/20 en tampon Owren-Koller (Diagnostica Stago), ou d'unicalibrator humain (plasma standard international de calibration pour le dosage des facteurs de la coagulation, Diagnostica Stago) est déposé dans chaque cupule et incubé pendant 4 min à 37 °C.



Le temps de coagulation est mesuré après addition de 100  $\mu$ l de Fibriquick (thrombine bovine à 100 unités NIH/ml, Biomérieux-Trinity Biotech, Bray, Irlande).

#### **VI.4.3.3. Le dosage de la prothrombine et du FVIII**

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

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

Un volume de 50  $\mu$ l de plasma à étudier, dilué au 1/40 et 1/80 en tampon Owren-Koller, est déposé dans chaque cupule, 50  $\mu$ l de plasma déficient en FVIII (Dade Behring) et 50  $\mu$ l de C.K.Prest (Diagnostica Stago) sont ajoutés. Les cupules sont placées à 37 °C pendant 240 s. Le temps de coagulation est mesuré après addition de 50  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  (25 mM).

#### **VI.4.3.4. Le dosage de l'activité procoagulante des phospholipides**

Une gamme étalon est réalisée avec des vésicules phospholipidiques (VP) constituées d'un mélange de phosphatidyl-choline, sérine et éthanolamine (Pc/Ps/Pe) à 60/20/20 mol % dans du TBS (Tris 50 mM, NaCl 175 mM,  $\text{NaN}_3$  0,02 %, pH 7,9) contenant de la BSA à 2 mg/ml. Les dépôts s'effectuent en triple dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb » à raison de 50  $\mu$ l de

spécimen (VP, ou plasma), 50 µl d'un mélange de CaCl<sub>2</sub> 5 mM, FXa (1,2 nM) et FVa (2,4 nM) et 50 µl d'un mélange de prothrombine (6 µM) et de S2238 (substrat chromogène de la thrombine) (0,6 mM) ; (prothrombine, FXa et FVa bovins ; Synapse B.V., Maastricht, Pays-Bas). Dans ces conditions, l'activité de la prothrombinase est linéaire et dépendante de la quantité de Ps sur une gamme de 2 % à 20 %. Après une incubation de 5 min dans le noir à température ambiante, l'absorbance est lue à 405 nm (la lecture est faite en cinétique toutes les 30 s pendant 10 min). La concentration en phospholipides procoagulants (PPA) dans les plasmas a été estimée à partir du taux initial de formation de thrombine par référence à la gamme étalon.

La mesure de l'activité PPA à la surface de cellules la lecture se fait par fluorescence. Le substrat chromogène est alors remplacé par le substrat fluorogène (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). La fluorescence au niveau de la plaque (MICROTESTTM96) est, lue à l'aide du fluorimètre Fluoroskan Ascent (Labsystems) avec le logiciel dédié (Ascent software 2.6). La lecture est faite toutes les minutes pendant 30 min avec une longueur d'onde d'excitation de 390 nm ainsi qu'une longueur d'onde d'émission de 460 nm.

Les résultats sont exprimés en nM équivalents de Ps.

#### **VI.4.4. La mesure de la conversion de protéine C (PC) en PCa à la surface des CE**

Les CE subconfluentes cultivées en plaques 96 puits à fond plat (MICROTESTTM96) sont lavées avec un tampon Hèpès 20 mM, 150 mM NaCl, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7,4. Un volume de 50 µL de protéine C (purifiée au laboratoire) à 65 nM est ajouté avec 50 µL de thrombine bovine (DiaThrombin, DiaMed SA, Cressier s/Morat, Suisse) à des concentrations croissantes (de 0 nM à 40 nM préparées dans le tampon de lavage HBS-CaCl<sub>2</sub>) aux cellules adhérentes à 37 °C. Après 1 h, la thrombine est inhibée avec 10 µL d'hirudine à 500 nM. Pour chaque échantillon, 100 µL sont transférés dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb » contenant 50 µL du substrat PCa S2366 à 0,4 mM. L'absorbance est lue à 405 nm sur une durée de 30 min et la concentration en PCa formée est déterminée à l'aide d'une courbe étalon tracée à partir de concentrations croissantes en PCa purifiée préparée au laboratoire de 0 nM à 5 nM<sup>303</sup>.

#### VI.4.5. Le test de fibrinolyse

La fibrinolyse peut être évaluée par lecture de la densité optique du caillot. Ce test est utilisé pour mesurer le temps de demi-lyse du caillot et ainsi déterminer la capacité fibrinolytique d'un plasma. Un mélange en tampon de Lisman (Hépès 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 3,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, albumine 0,1 %, ajusté à pH 7,4), contenant 5 pM de FT recombinant humain Innovin® (Siemens), des VP constituées de Pc/Ps/Pe dans un rapport 60/20/20 moles% à 4 µM équivalent Ps 5 nM de TM de poumon de lapin (American Diagnostica), et 4 µg/ml de t-PA recombinant humain Actilyse® (Boehringer Ingelheim) est réalisé. Quarante microlitres de ce mélange sont ajoutés dans chaque puits d'une plaque transparente à fond rond (Greiner). Vingt microlitres de plasma sont ajoutés. Les expériences sont réalisées en triplicate pour chaque échantillon. La coagulation est déclenchée par recalcification du plasma à raison de 10 µl/puits de CaCl<sub>2</sub> à 100 mM. La lecture se fait toutes les minutes pendant 180 min à 405 nm à 37 °C.

#### VI.5. Imagerie des caillots de fibrine

Les générations de thrombine ont été réalisées sur des disques de papiers absorbant en utilisant la même technique que celle décrite pour la mesure de génération de thrombine en sang total<sup>304</sup>. Les concentrations finales en TF et VP étaient respectivement de 5 pM et 4 µM.

Le caillot est fixé 50 min après avoir déclenché la génération de thrombine. L'huile minérale utilisée pour empêcher l'évaporation dans les puits est retirée et une solution de glutaraldehyde en PBS (PBS Sorensen, pH 7,2) est ajoutée. Les puits sont conservés 1 h à température ambiante puis une nuit à 4 °C. Les échantillons sont ensuite lavés 5 fois en PBS et une seconde fixation est réalisée avec de l'OsO<sub>4</sub> (1%) en cacodylate de sodium (200 nM, pH 7,4) pendant 1 h à température ambiante. Les échantillons sont ensuite déshydratés par bains d'éthanol successifs de 3 min à 30, 50, 70, 90 et 100 %. Le bain à 100 % d'éthanol est renouvelé 3 fois. La déshydratation est ensuite terminée par une solution d'hexaméthylsilazane et d'éthanol dans un rapport 1 : 1 pendant 3 min puis d'hexaméthylsilazane pendant 10 min.

Les disques sont ensuite retirés des puits et laissés à sécher puis attachés à une plaque recouverte d'or (Quorum Q150 RS) pour la visualisation au microscope électronique (Phenom G2 pro). La

taille des fibres et des pores est ensuite analysée à l'aide du logiciel spécialisé Fibermetric software (PhenomWorld, Pays-Bas)

## **VI.6. Le modèle de thrombose carotidienne induite au FeCl<sub>3</sub>**

Les souris sont anesthésiées avec du pentobarbital (50 mg/kg) injecté en intra-péritonéal. Les artères carotides sont mises à nu et le flux sanguin est mesuré à l'aide d'une sonde à ultrasons (0,5 PSB Nanoprobe, Transonic, Ithaca, NY) au niveau de la carotide gauche. Le thrombus est déclenché en appliquant deux morceaux de papier-filtre, imbibés de solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> à 3 % sur l'extérieur de la carotide. Après 3 min, les papiers-filtres sont retirés et le vaisseau lavé avec du sérum physiologique. Le flux est enregistré 5 min avant l'application des papiers-filtres et l'occlusion totale des vaisseaux est contrôlée après chaque expérience. Les résultats sont analysés par le programme dédié IOX (EMKA Technologies, Paris, France) après avoir converti le signal à l'aide d'un convertisseur analogique-à-digital.

## **VI.7. La culture cellulaire**

### **VI.7.1. L'isolement et la culture de cellules endothéliales (CE) et de CML de rats SHR**

Les CE et les CML vasculaires ont été isolés à partir d'aorte de rats SHR et Wistar selon le protocole de Battle et coll<sup>305</sup>. Les rats sont anesthésiés à l'isoflurane puis mis à mort par exsanguination. L'aorte thoracique est prélevée en conditions stériles. L'intérieur de l'aorte est ensuite rincé avec du tampon phosphate salin (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 10,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Invitrogen). L'adventice est retiré aseptiquement sous loupe binoculaire, puis l'artère est coupée en anneaux. Ces anneaux sont mis à incuber sous agitation au bain-marie en présence de collagénase I (Worthington) à 37 °C pendant 40 min. Les anneaux sont ensuite resuspendus 10 fois avec une pipette, puis filtrés sur une compresse stérile placée au-dessus d'un tube Falcon. Le filtrat est centrifugé à 570 g pendant 5 min à température ambiante et les CE récupérées dans le culot qui est resuspendu dans du milieu Endothelial Cell Growth Medium-2

(EGM<sup>®</sup>-2) avec 2 % de sérum de veau fœtal, 10 % de sérum de cheval, et en présence de facteurs de croissance (Hydrocortisone, FGF-B, VEGF, R3-IGF-1, acide ascorbique, hEGF), d'héparine et de gentamycine. Les cellules sont laissées 40 min à 37 °C dans une flasque de 25 cm<sup>2</sup>. La flasque est lavée 2 fois avec 2,8 ml de milieu de culture par boîte afin de retirer les cellules qui n'ont pas adhéré, puis elles sont remises à 37 °C. Pour préparer les CML, les anneaux sont récupérés sur la compresse, puis incubés sous agitation pendant 1 h à 37 °C avec de la collagénase II (Worthington) à 1 mg/ml et de l'élastase I (Worthington) à 0,5 mg/ml dans du PBS. La digestion enzymatique est arrêtée en ajoutant une quantité identique de DMEM/F-12 (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco<sup>®</sup>) contenant 10 % de SVF (Sigma<sup>®</sup>) ainsi que des antibiotiques (100 U/ml de pénicilline- streptomycine). Les cellules sont ensuite centrifugées à 250 g pendant 10 min et comptées à l'aide d'un hématocytomètre (Naeber). Des flasques de culture de 75 cm<sup>2</sup> ou de 25 cm<sup>2</sup> contenant 10 ml ou 5 ml sontensemencées à raison de 4 000 à 5 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à subconfluence des cellules.

#### Caractérisation des cellules :

Les cellules en culture primaire sur des labteck sont rincées au PBS puis fixées avec du PBS/paraformaldehyde 4 % pendant 10 min à 20 °C et à nouveau rincées trois fois avec du PBS. Les cellules sont perméabilisées avec un tampon Triton X100 0.5 % en TBS (TBS-T) (Tris 50 mM, NaCl 175 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02 %, pH 7,9) pendant 15 min à 20 °C. Les cellules sont incubées avec les anticorps primaires, anti- $\alpha$ SMA (Sigma) pour les CML, anti-vWF et anti-CD31 (Abcam) pour les CE, pendant 1 h à 20 °C sous agitation lente. Les cellules sont ensuite lavées trois fois dans du TBS-T, puis incubées avec l'Envision (Vector Laboratories) pendant 30 min à 20 °C. Le labteck est lavé deux fois avec du PBS puis démonté. Les lames sont plongées dans du DAB (DAKO LSAB<sup>®</sup>) dilué au 1/1000 dans du PBS. Les cellules sont déshydratées à l'éthanol 70 %, puis au toluène ; les lames sont montées à l'Eukitt (O. Kindler gmbh & co Mikroskopische Gläser) pour être observées au microscope.

### VI.7.2. La culture de CE aortiques humaines (HAEC)

Les cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC) (Lonza, Basel, Switzerland), sont cultivées jusqu'à subconfluence en milieu de culture Clonectics<sup>®</sup> EGM<sup>®</sup>-2 et utilisées de passage 5 à passage 7. Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup>, la multiplication est effectuée en rinçant les boîtes deux fois avec du PBS (à température ambiante) puis en les incubant 5 min à 37 °C avec de la trypsine-EDTA (Gibco<sup>®</sup>). Une observation au microscope est effectuée pour s'assurer que les cellules sont bien décollées, et 5 ml de milieu de culture sont ensuite ajoutés pour inhiber les effets de la trypsine. Les cellules sont ensuite centrifugées à 250 g pendant 10 min à température ambiante. Le culot est resuspendu dans du milieu de culture qui sera distribué dans de nouvelles boîtes de 75 cm<sup>2</sup>, ou, pour les expériences de thrombinographies, de mesure de conversion de PC en PCa ou de test PPA, et d'extractions de protéines ou d'ARN, dans des plaques de 6 ou 96 puits (les cellules sontensemencées à raison de 7 500 cellules/puits pour les plaques 96 puits (MICROTESTTM96), et 120 000 cellules par puits pour les plaques de 6 puits).

Dans le cadre des expériences nécessitant un traitement à l'aldostérone en présence ou non d'un antagoniste du MR ou du GR, les cellules sont cultivées en milieu de culture avec sérum destéroïdé pendant 18 h (ayant pris soin de ne pas ajouter l'hydrocortisone dans le milieu clonectics). Le sérum destéroïdé est préparé en ajoutant à 250 ml de sérum de veau fœtal, 2,5 g de charbon (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) et 0,25 g de dextran (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Le tout est incubé sous agitation 30 min à 56 °C, puis centrifugé 15 min à 5 000 g. Le surnageant est ensuite récupéré l'ensemble des opérations sont répétées une seconde fois. Après la seconde centrifugation le surnageant est filtré une première fois sur papier Wathman, puis une seconde fois avec un filtre de 0,22 µm. Le sérum est ensuite aliquoté par 50 ml et congelé à -20 °C.

Les cellules sont ensuite traitées 24 h avec 10<sup>-8</sup> M d'aldostérone (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), avec ou sans 10<sup>-6</sup> M d'antagoniste du MR RU28318 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) ou 10<sup>-6</sup> M d'antagoniste du GR RU486 (Mifepristone) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Les cellules sont traitées 1 h avec les antagonistes avant d'ajouter l'aldostérone dans le milieu de culture.

### VI.8. Extraction de l'ARN et la mesure de l'expression des gènes

Les cellules sont cultivées en plaques 6 puits jusqu'à confluence, puis lavées avec du tampon PBS. L'ARN total est extrait à l'aide du kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) en suivant les recommandations du fournisseur. L'ARN est ensuite dosé par spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm avec un appareil NanoDrop drop 1000 (Thermo Scientific, USA). La Transcription inverse est réalisée à l'aide d'un mélange de 1 µg d'ARN, 10 µM d'oligo dT, 25 mM de dNTP, un inhibiteur de RNAses, 200 U de M-MuLV Reverse Transcriptase, ainsi que du tampon de réaction (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). La réaction est réalisée à 42 °C pendant 90 min, puis arrêtée en étant chauffée à 72 °C pendant 10 min. Les ADN complémentaires sont dilués pour être utilisés pour la PCR quantitative et conservés à -20 °C. Les PCR quantitatives en temps réel sont réalisées avec le SYBR green PCR technology (Bio-Rad, Hercules, CA) en utilisant les amorces présentées **tableau 7** selon les conditions suivantes : une étape de dénaturation de 3 min à 95 °C suivie de 40 cycles commençant chacun par une étape de dénaturation de 10 s à 95°C ; puis 45 s à la température d'hybridation ( $T_h$ ) ; et 60 s à 72 °C. L'expression est exprimée en comparaison de l'expression de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) à l'aide du logiciel MyiQ (Bio-Rad).

Gene	Amorce sens (5' – 3')	Amorce anti-sens (5' – 3')	$T_h$ (°C)
PROCR	GGCAGTTTCATCATTGCTGG	TTGAACGCC TCAGGTGATTC	62
THBD	TAACGAAGACACAGACTGCATT	CTAGCCCCACGAGGTCAAGGT	60.5
TFPI	ATTCACGGTCCCTCATGGTGTCT	GGCGGCATTTCCCAATGACTGAAT	62
GAPDH	CAGCCTCAAGATCATCAGCA	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA	60

**Tableau 7 :** Séquence des amorces

### **VI.9. L'immunohistochimie et l'immunocytochimie**

Les CE et les cryosections d'aorte de souris sont fixées avec du paraformaldehyde (4% poids/volume TBS ; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6) pendant 10 min, puis avec 5 % de TBS-BSA pendant 30 min. Les HAEC sont incubées 1 h à température ambiante avec un anticorps anti-ECPR dilué au 1/50 (mouse monoclonal, R&D Systems) ainsi qu'un anticorps de lapin polyclonal anti-TM dilué au 1/50 (Santa Cruz Biotechnology). L'anticorps anti-souris conjugué DyLight488 dilué au 1/100 (Abcam) ou l'anticorps anti-lapin conjugué DyLight549 dilué au 1/100 (Abcam) sont incubés 1 h à température ambiante. Les sections aortiques sont incubées avec un anticorps anti-EPCR dilué au 1/100 (EBioscience San Diego CA) pendant 1 h à température ambiante, puis avec un anticorps secondaire anti-chèvre biotinylé dilué au 1/100 (Santa Cruz Biotechnology) pendant 1 h suivi du conjugué streptavidine Cy3 (Jackson Biotechnology) pendant 30 min. Les noyaux sont colorés avec du DAPI (Sigma). Les cellules et les cryosections sont observées par fluorescence en microscopie confocale (LEICA TCS SP5, Wetzlar, Germany).

### **VI.10. Les statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (ESM). La comparaison entre les rats Zucker obèses et les témoins non obèses (effet souche), ou entre les différents groupes d'âge (effet âge) a été réalisée en utilisant le test ANOVA à deux facteurs au seuil de risque de 5 %. Nous avons également utilisé le test de Fisher pour comparer deux groupes en cas de résultat ANOVA positif.

En ce qui concerne l'étude portant sur les souris RM-CE, les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (ESM). La comparaison a été réalisée en utilisant un test t de Student apparié ou non apparié.

L'analyse statistique de la cohorte EPHEBUS a été réalisée à l'aide du programme SAS V9.22 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Le seuil de significativité a été fixé à 5 %. Une analyse univariée a été réalisée en utilisant les tests de Mann-Whitney et du Chi<sup>2</sup>. Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type (SD) pour les variables continues et en fréquence



(pourcentage) pour les variables catégorielles. Dans l'analyse multivariée, 17 covariables basales ont été testées : traitement, hypertension, sexe, âge, pression (PAS, PAD, PAM, PP), fréquence cardiaque, FEVG, taux circulant de potassium, ratio estimé de filtration glomérulaire (eGFR), thérapie de reperfusion, IECA, ARA, bêta-bloquants diurétiques, nitrates. La VOP a été testée dans les sous-groupes concernés. L'association entre ces variables et la mortalité avec ou sans hospitalisation pour des causes cardiovasculaires a été réalisée avec une régression de Cox. Les facteurs associés avec la PP et la VOP ont été identifiés avec une régression linéaire en analyse multivariée.

## VII. RESULTATS

### VII.1. L'Etude de l'hémostase du rat Zucker

Le rat Zucker est un modèle de SMet présentant les mêmes anomalies que celles qui définissent le SMet chez l'homme. Une grande partie des patients atteints d'IC sont également atteints d'une ou plusieurs anomalies présentes dans le SMet. L'hémostase commence à être considérée depuis quelques années comme étant un aspect important, et pourtant jusqu'à présent sous-estimé, de l'IC. De plus, l'IC est une maladie des personnes vieillissantes. Pour toutes ces raisons nous avons dans un premier temps étudié l'hémostase chez les rats Zucker de 25 et à 80 semaines.

#### VII.1.1. Les paramètres morphologiques, hémodynamiques et métaboliques

Le **tableau 8** présente les paramètres morphologiques, hémodynamiques et métaboliques des rats utilisés pour cette étude<sup>275</sup>. Les rats obèses présentent à 25 semaines une obésité, une augmentation de la PA, du cholestérol et de l'insuline. A 80 semaines, les mêmes variations sont observées à l'exception du taux d'insuline qui est effondré, signe de la présence d'un diabète de type 2. Les rats Zucker obèses présentent donc à 25 comme à 80 semaines les mêmes altérations que celles qui permettent de caractériser le SMet humain.

#### VII.1.2. La numération sanguine

La numération sanguine des rats Zucker a été réalisée sur du sang anticoagulé par du citrate c'est-à-dire dilué à 10 %. Les résultats sont présentés dans le **tableau 9**. Les rats obèses présentent une diminution du nombre d'érythrocytes quel que soit leur âge par rapport aux rats non obèses. Il y a également une diminution avec le vieillissement du nombre d'érythrocytes chez les rats obèses. L'hématocrite et l'hémoglobine ont tendance à diminuer dès 25 semaines chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses, mais cette diminution ne devient significative qu'à 80 semaines. Pour les érythrocytes, comme pour l'hématocrite et l'hémoglobine, l'interaction est significative,

indiquant que le vieillissement altère d'avantage ces paramètres dans le cadre du SMet. En ce qui concerne la numération plaquettaire elle est augmentée chez les rats obèses à 25 comme à 80 semaines. L'âge n'a ici pas d'influence, ni chez les rats obèses ni chez rats non obèses. Le volume plaquettaire moyen n'est modifié dans aucun des groupes.

Le compte global des leucocytes est significativement différent à 80 semaines chez les rats obèses. Une augmentation est présente à la fois par rapport aux rats non obèses de 80 semaines, mais également par rapport aux rats obèses de 25 semaines. Ici aussi l'interaction significative démontre un impact positif du SMet dans le vieillissement sur le nombre de leucocytes.

RESULTATS

Souche Age n	25 semaines		80 semaines		Souche	Age	Interaction
	Fa/- 9	fa/fa 9	Fa/- 9	fa/fa 9			
Masse corporelle (g)	398 ± 6	567 ± 12*	427 ± 17	546 ± 27*	<b>&lt;0,0001</b>	0,807	0,13
PAS consciente (mmHg)	158 ± 2	165 ± 2*	134 ± 8#	178 ± 10*	<b>&lt; 0,05</b>	NS	<b>&lt; 0,01</b>
Cholestérol (mmol/l)	1,2 ± 0,1	5,6 ± 0,3*	2,5 ± 0,1#	6,1 ± 0,4*	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	NS
Insuline (ng/ml)	0,66 ± 0,06	10,50 ± 1,43*	2,02 ± 0,48	2,10 ± 0,71*#	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

**Tableau 8 :** Paramètres morphologiques, hémodynamiques et métaboliques des rats Zucker obèses et non obèses. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. \* P < 0,05, obèses vs non obèses au même âge ; # P < 0,05 80 semaines vs 25 semaines pour la même souche. PAS : pression artérielle systolique.

Souche Age n	25 semaines		80 semaines		Souche	Age	Interaction
	Fa/- 9	fa/fa 9	Fa/- 9	fa/fa 9			
Erythrocytes (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	6,4 ± 0,1	5,7 ± 0,1*	6,1 ± 0,2	4,6 ± 0,3*#	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,031</b>
Hématocrite (%)	30,0 ± 0,8	27,6 ± 0,4	29,8 ± 0,6	23,1 ± 1,3*#	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,009</b>	<b>0,013</b>
Hémoglobine (g/dl)	11,0 ± 0,2	10,4 ± 0,2	10,7 ± 0,3	8,4 ± 0,5*#	<b>0,0002</b>	<b>0,001</b>	<b>0,017</b>
Plaquettes (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	574 ± 37	789 ± 34*	633 ± 29	834 ± 63*	<b>&lt; 0,0001</b>	0,232	0,872
VMP (µm <sup>3</sup> )	11,0 ± 0,2	10,4 ± 0,2	10,7 ± 0,3	8,4 ± 0,5	0,116	0,248	0,697
Leucocytes (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	3,0 ± 0,3	3,2 ± 0,3	2,1 ± 0,2	4,6 ± 0,7*#	<b>0,003</b>	0,538	<b>0,011</b>

**Tableau 9 :** Numération sanguine des rats Zucker obèses et non obèses. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. \* P < 0,05, obèses vs non obèses au même âge ; # P < 0,05 80 semaines vs 25 semaines pour la même souche. VMP : volume plaquettaire moyen.

### VII.1.3. Les dosages des facteurs de la coagulation

Le **tableau 10** présente les résultats des dosages des facteurs de la coagulation déterminant la réactivité de la génération de thrombine. Le FT, facteur déclenchant la voie extrinsèque de la coagulation, est très significativement augmenté chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses et ce quel que soit l'âge. Le vieillissement n'a pas d'influence significative sur le FT circulant. L'activité du TFPI varie dans le même sens que le FT avec une augmentation chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses aux deux âges avec cependant une diminution significative chez les rats obèses de 80 semaines par rapport aux mêmes rats de 25 semaines.

Le FVIII présente une tendance à l'augmentation chez les rats obèses de 25 semaines par rapport à leurs contrôles. L'augmentation est significative et importante à 80 semaines à la fois par rapport aux rats non obèses du même âge, et par rapport aux rats obèses de 25 semaines. L'interaction très positive ( $p = 0,001$ ) indique un rôle prépondérant du SMet dans les variations du FVIII observées avec le vieillissement. Le facteur vWF, est augmenté chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses quel que soit l'âge. Une augmentation significative est également observée avec l'âge chez les rats obèses.

Les taux de prothrombine sont augmentés à 25 comme à 80 semaines chez les rats obèses par rapport à leurs contrôles. Il y a une tendance à l'augmentation avec l'âge chez les rats obèses, augmentation qui est en revanche significative chez les rats non obèses. Le dosage des taux circulants d'AT n'a pas montré de différence entre les groupes.

RESULTATS

Souche Age n	25 semaines		80 semaines		Souche	Age	Interaction
	Fa/- 8	fa/fa 10	Fa/- 12	fa/fa 8			
FT (pM)	0,3 ± 0,1	12,2 ± 1,7*	2,0 ± 0,4	9,9 ± 1,5*	<0,0001	0,838	0,095
Activité TFPI (U/ml)	4,9 ± 0,2	11,2 ± 0,2*	5,4 ± 0,3	10,0 ± 0,6*#	< 0,0001	0,261	0,01
FVIII (%)	104 ± 29	190 ± 34	124 ± 28	466 ± 53*#	< 0,0001	0,0004	0,001
vWF (µg/ml)	3,0 ± 0,5	3,9 ± 0,2*	3,5 ± 0,2	5,0 ± 0,3*#	< 0,0001	0,004	0,114
Prothrombine (%)	94 ± 3	223 ± 19*	155 ± 14	264 ± 16*	< 0,0001	0,002	0,522
Antithrombine (%)	129 ± 2	125 ± 2	127 ± 1	123 ± 2	0,045	0,46	0,94
F1+2 (pmol/l)	4,1 ± 0,5	7,9 ± 1,0*	5,8 ± 1,2#	5,5 ± 0,9	0,09	0,74	0,05
Complexes TAT (µg/ml)	1,2 ± 0,1	4,8 ± 2,3	15,5 ± 4,0*	10,4 ± 2,1	0,859	0,004	0,473

**Tableau 10 :** Paramètres hémostatiques des rats Zucker obèses et non obèses. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. \* P < 0,05, obèses vs non obèses au même âge ; # P < 0,05 80 semaines vs 25 semaines pour la même souche. FT : facteur tissulaire ; TFPI : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire ; FVIII : facteur VIII ; vWF : facteur von Willebrand ; F1+2 : fragments 1 + 2 de la prothrombine ; TAT : complexes thrombine/anti-thrombine.

En ce qui concerne les marqueurs de la génération de thrombine in vivo les fragments F1+2 de la prothrombine sont augmentés significativement à 25 semaines chez les rats obèses. Les complexes TAT ont une tendance à augmenter chez les rats obèses par rapport à leurs contrôles à 25 semaines. Seule une augmentation significative est observée pour les rats obèses de 80 semaines par rapport aux rats de 25 semaines.

#### **VII.1.4. La génération de thrombine en PDP et PRP**

La mesure de la génération de thrombine par thrombinographie permet de quantifier la capacité d'un plasma à activer de la prothrombine en thrombine en déclenchant la voie extrinsèque de la coagulation. Les résultats des thrombinographies en PDP sont présentés **figure 37** et **tableau 11**. Le temps de latence présente une tendance à la diminution chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses quel que soit l'âge. Le pic de génération de thrombine n'est pas modifié tandis que le temps pour atteindre ce pic est significativement augmenté chez les rats obèses à 25 comme à 80 semaines. Le temps pour atteindre le pic est également augmenté avec l'âge chez les rats non obèses. La vélocité présente une diminution significative à 25 semaines chez les rats obèses par rapport à leurs contrôles, mais pas à 80 semaines.

En ce qui concerne l'ETP, la quantité totale de thrombine générée au cours du temps, une augmentation significative est observée chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses à 25 comme à 80 semaines. Il n'y a pas ici de variation avec l'âge, ce qui signifie que les altérations au niveau de la génération de thrombine dans le SMet sont présentes dès 25 semaines et ne sont pas aggravées avec le vieillissement.

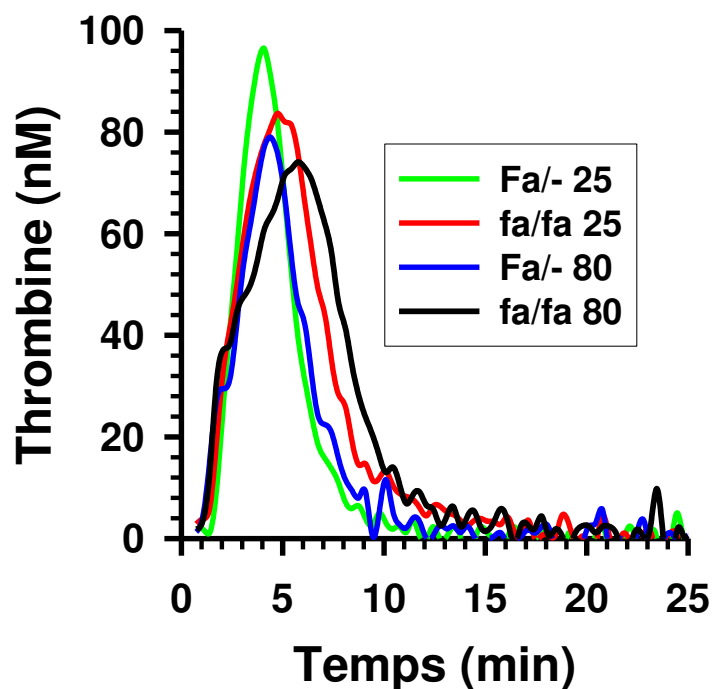
Ces courbes de génération de thrombine sont atypiques dans le sens où, malgré l'augmentation de l'ETP, il n'y a pas d'augmentation du pic ou du temps pour l'atteindre. Par contre, il y a donc diminution de temps pour inhiber la génération de thrombine. Cela va avoir pour conséquence une augmentation de la génération totale de thrombine chez les rats obèses. Ainsi la différence ne semble pas imputable à une augmentation des facteurs procoagulants impliqués dans la génération de thrombine mais plutôt à une altération de l'inhibition.

RESULTATS

Souche Age n	Fa/-	fa/fa	Fa/-	fa/fa	Souche	Age	Interaction
	25 semaines		80 semaines				
	8	10	12	8			
Temps de latence (min)	1,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,2	0,067	0,083	0,94
Pic de génération (nM)	90 ± 11	77 ± 3	74 ± 3	81 ± 6	0,917	0,309	0,079
Temps pour atteindre le pic (min)	4,3 ± 0,1	5,2 ± 0,1*	4,9 ± 0,2#	5,5 ± 0,2*	<b>0,003</b>	<b>0,017</b>	0,55
Vélocité (nM/min)	38,0 ± 5,6	21,6 ± 1,2*	27,3 ± 1,8#	23,0 ± 2,5	<b>0,002</b>	0,112	<b>0,035</b>
ETP (nM.min)	328 ± 27	428 ± 29*	306 ± 12	422 ± 30*	<b>&lt; 0,0001</b>	0,59	0,76

**Tableau 11 :** Paramètres de génération de thrombine dans le PDP des rats Zucker obèses et non obèses. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. \* P < 0,05, obèses vs non obèses au même âge ; # P < 0,05 80 semaines vs 25 semaines pour la même souche.





**Figure 37 :** Courbes typiques de génération de thrombine chez les rats Zucker obèses et non obèses.

Les résultats des thrombinographies en PRP sont présentés dans le **tableau 12**. Tous les paramètres des rats obèses à 25 semaines sont en faveur d'une augmentation de la génération de thrombine par rapport aux rats non obèses à l'exception du temps de latence et du temps pour atteindre le pic qui eux sont augmentés. A 80 semaines l'ETP est augmenté et le temps pour atteindre le pic diminué chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses. En revanche, la génération de thrombine est diminuée chez les rats obèses de 80 semaines par rapport à leurs homologues de 25 semaines. De la même manière que pour les mesures de génération de thrombine en PDP il y a un décalage des courbes vers la droite chez les rats obèses indiquant une plus faible activité des systèmes inhibiteurs de la coagulation.

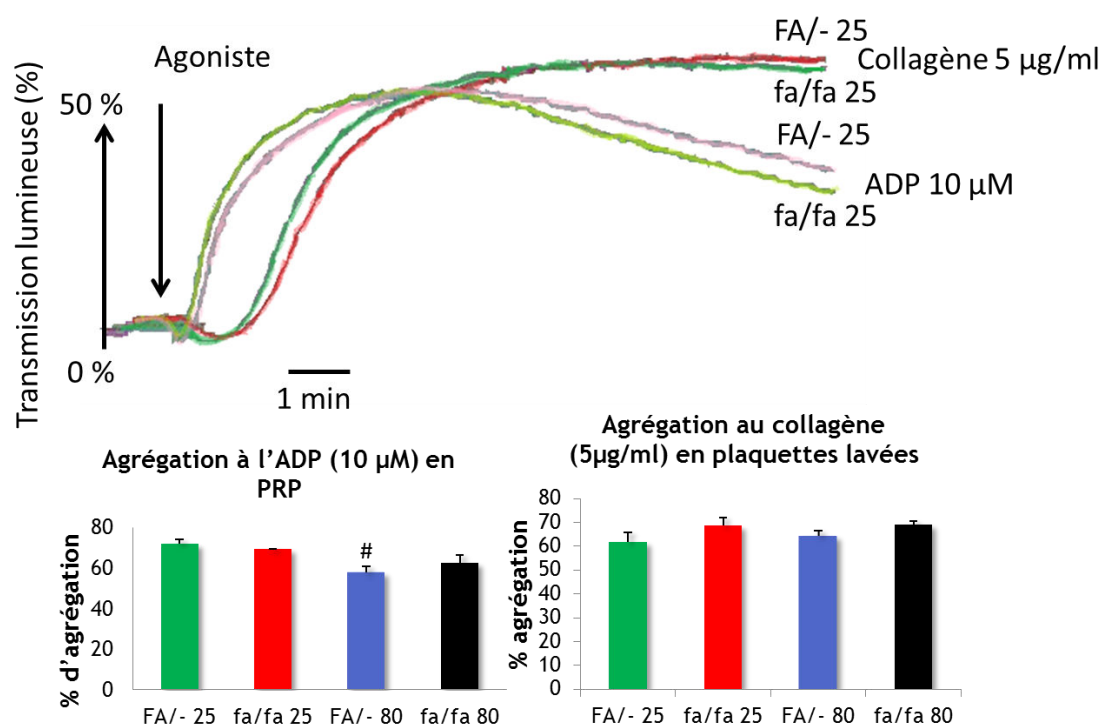
RESULTATS

Souche Age n	25 semaines		80 semaines		Souche	Age	Interaction
	Fa/- 10	fa/fa 10	Fa/- 9	fa/fa 9			
Temps de latence (min)	2,9 ± 0,2	4,1 ± 0,3*	2,4 ± 0,2	2,8 ± 0,3#	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	0,14
Pic de génération (nM)	164 ± 5	256 ± 5*	177 ± 11	179 ± 10#	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0004</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
Temps pour atteindre le pic (min)	5,9 ± 0,3	7,1 ± 0,4*	5,4 ± 0,3	6,8 ± 0,5*	<b>0,001</b>	0,31	0,83
Vélocité (nM/min)	56 ± 3	89 ± 4*	57 ± 6	47 ± 5#	0,02	<b>0,0004</b>	<b>0,0002</b>
ETP (nM.min)	768 ± 42	1400 ± 93*	839 ± 38	1152 ± 126*#	<b>&lt; 0,0001</b>	0,29	0,06

**Tableau 12 :** Paramètres de la génération de thrombine dans le PRP des rats Zucker obèses et non obèses. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. \* P < 0,05, obèses vs non obèses au même âge ; # P < 0,05 80 semaines vs 25 semaines pour la même souche.

### VII.1.5. L'agrégation plaquettaire

La réactivité des plaquettes a été mesurée par agrégation plaquettaire en PRP ou en plaquettes lavées, les résultats sont présentés **figure 38**. L'agoniste permettant la meilleure agrégation a été utilisé pour chacune des conditions, à savoir, de l'ADP pour le PRP et du collagène pour les plaquettes lavées. En effet, alors que chez l'homme les agrégations en plaquettes lavées et en PRP sont chacune possibles avec de l'ADP et du collagène, chez le rat les plaquettes lavées ne s'agrègent pas avec de l'ADP et les plaquettes en PRP ne s'agrègent pas avec du collagène. Les agrégations déclenchées avec de l'ADP sont réversibles tandis que les agrégations déclenchées avec du collagène sont irréversibles. Seul le pourcentage maximal d'agrégation est présenté dans la mesure il est représentatif des autres paramètres calculés au niveau des courbes d'agrégation. Aucune différence significative n'a été observée au niveau des agrégations déclenchées avec du collagène. Seule une diminution significative du pourcentage total d'agrégation est observée entre les rats non obèses de 80 semaines et ceux de 25 semaines avec une agrégation déclenchée à l'ADP.



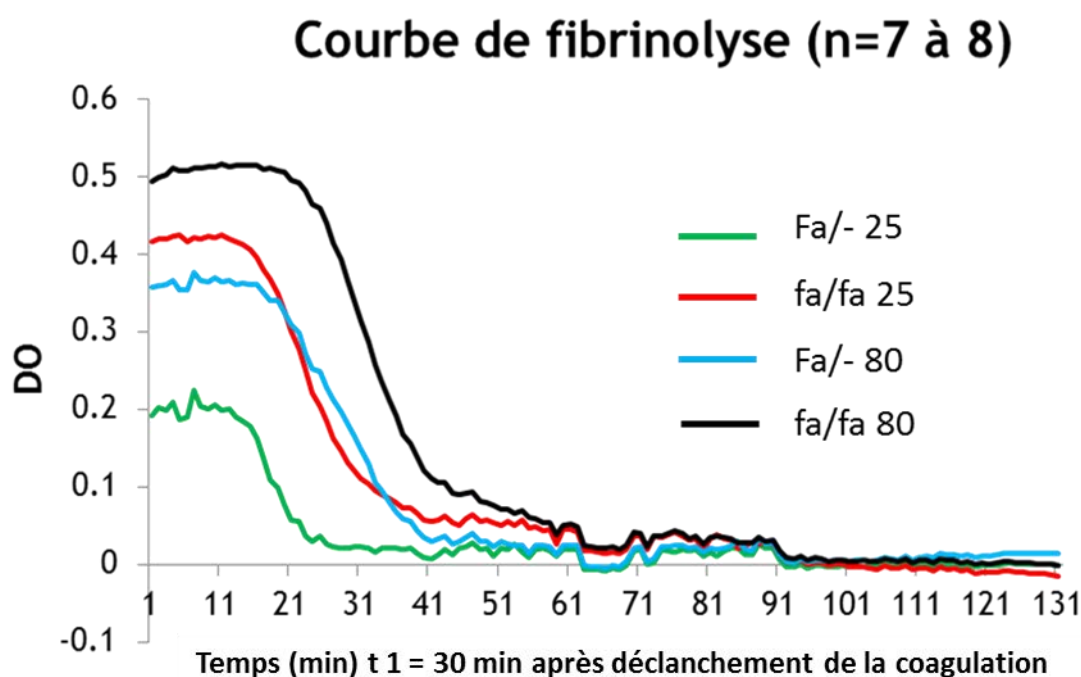
**Figure 38 :** Agrégation des plaquettes des rats Zucker obèses et non obèses. Les agrégations ont été réalisées en PRP ou en plaquettes lavées. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM. #  $P < 0,05$  80 semaines vs 25 semaines pour la même souche. Quatre rats par groupe ont été utilisés pour les agrégations en PRP et 10 rats par groupe ont été utilisés pour les agrégations en plaquettes lavées.

## VII.1.6. La fibrinolyse

### VII.1.6.1. Le test fibrinolytique

La capacité fibrinolytique des rats a été évaluée par un test de lyse de caillot en mesurant la densité optique (**figure 39** et **tableau 13**). Les concentrations circulantes de fibrinogène sont très significativement augmentées chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses aux deux âges. Le vieillissement augmente la concentration de fibrinogène chez les rats obèses, en revanche l'augmentation observée chez les rats non obèses n'atteint pas la significativité.

Le test fibrinolytique montre une augmentation du temps de demi-lyse du caillot chez les rats obèses par rapport aux rats contrôles aux deux âges. Il y a également une augmentation du temps de demi-lyse avec le vieillissement à la fois chez les rats obèses et les rats non obèses.



**Figure 39 :** Courbes de fibrinolyse chez les rats Zucker obèses et non obèses. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $P < 0,05$ , obèses vs non obèses au même âge ; #  $P < 0,05$  80 semaines vs 25 semaines pour la même souche. Test ANOVA pour le fibrinogène, effet souche :  $p < 0,0001$  ; effet âge :  $p = 0,0002$  ; interaction : 0,17.

RESULTATS

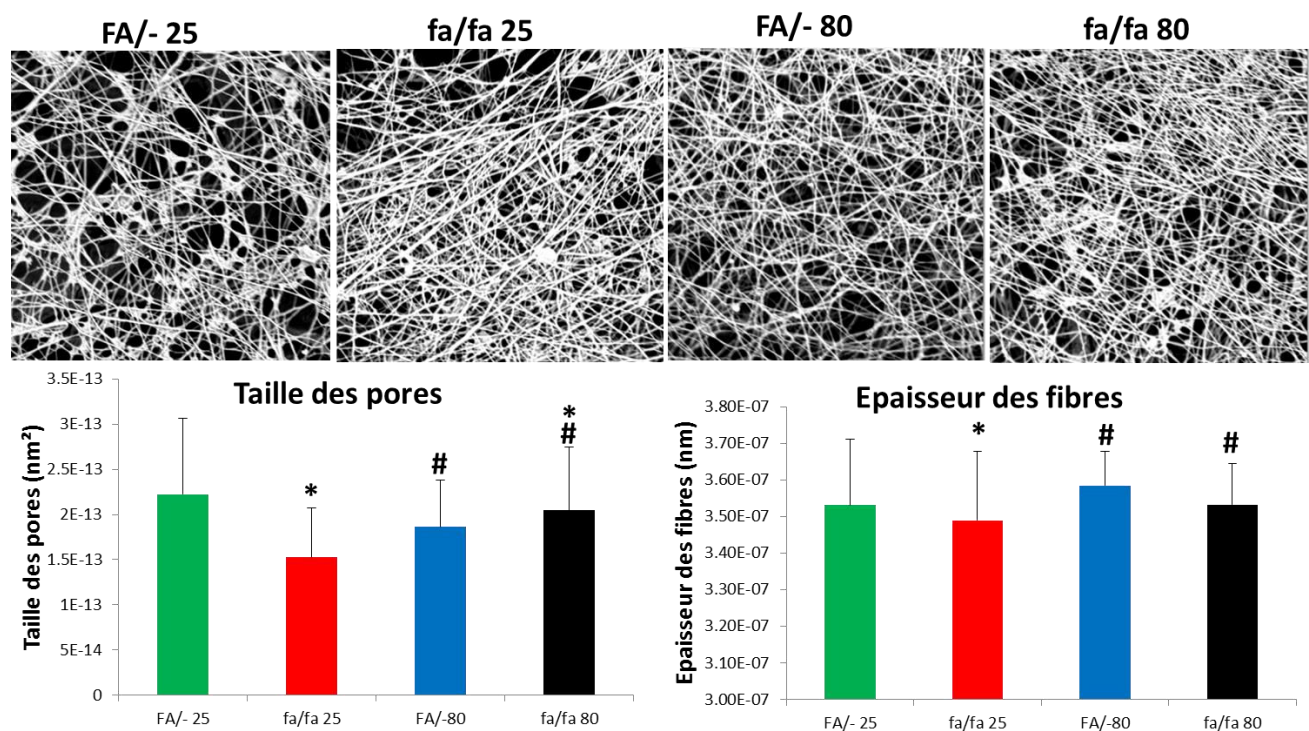
Souche Age (semaines) n	25 semaines		80 semaines		Souche	Age	Interaction
	Fa/- 8	fa/fa 8	Fa/- 8	fa/fa 7			
Fibrinogène (g/l)	2,8 ± 0,1	4,0 ± 0,2	3,2 ± 0,1	4,9 ± 0,2	< 0,0001	0,0002	0,17
Temps de demi-décroissance (min)	41 ± 1	46 ± 1*	49 ± 2#	54 ± 1*#	0,001	< 0,0001	0,907
Pic (DO)	0,23 ± 0,01	0,44 ± 0,02*	0,37 ± 0,05#	0,52 ± 0,05*	< 0,0001	0,003	0,39
Surfaces de 30 à 110 min (DO <sup>2</sup> )	3,3 ± 0,4	9,8 ± 0,7*	8,8 ± 1,6#	15,5 ± 2,0*#	<0,0001	0,0002	0,938

**Tableau 13 :** Paramètres de la fibrinolyse chez les rats Zucker obèses et non obèses. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. # P < 0,05 80 semaines vs 25 semaines pour la même souche. DO : densité optique.

### VII.1.6.2. L'analyse des caillots par microscopie

Pour une analyse fine de la structure des caillots, une mesure automatisée de la taille des pores, et du diamètre des fibres de fibrine a été réalisée par microscopie électronique (**Figure 40**). La taille des pores renseigne sur le nombre de fibres de fibrine présentes dans le caillot : - moins il y a de pores, plus le caillot est dense. L'épaisseur des fibres renseigne sur la vitesse à laquelle le caillot se forme. Plus les fibres sont fines, plus elles se sont formées rapidement.

La taille des pores est diminuée à 25 semaines chez rats obèses par rapport aux rats non obèses et est augmentée à 80 semaines. La taille des pores diminue avec l'âge chez les rats non obèses, tandis qu'elle augmente chez les rats obèses. Les fibres sont plus fines chez les rats obèses à 25 semaines par rapport aux rats non obèses mais pas à 80 semaines où la différence n'est pas significative. Il y a une augmentation avec l'âge dans les deux groupes de la taille des fibres.

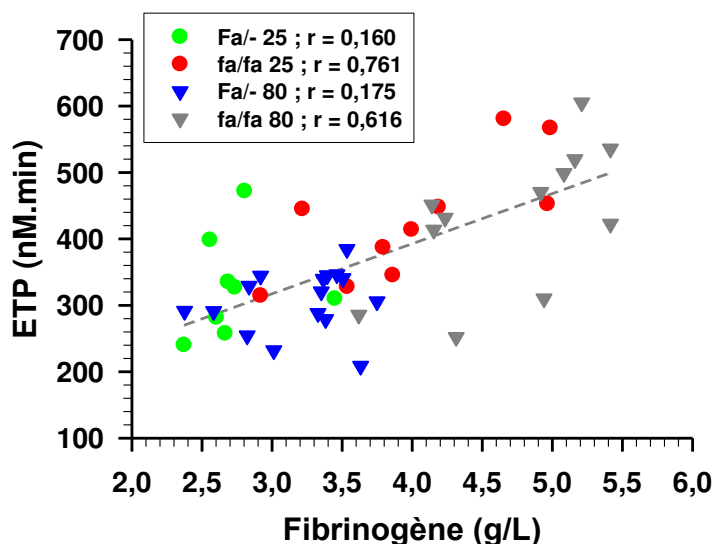


**Figure 40 :** Images et quantification du réseau de fibrine chez les rats obèses et non obèses. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $P < 0,05$ , obèses vs non obèses au même âge ; #  $P < 0,05$  80 semaines vs 25 semaines pour la même souche.

### VII.1.7. L'impact du fibrinogène sur la génération de thrombine

Les courbes de génération de thrombine des rats Zucker sont atypiques puisque, bien que l'ETP soit augmenté chez le rat obèse, il n'y a pas d'augmentation du pic de thrombine. De plus, les courbes de génération des rats obèses sont décalées vers la droite indiquant une diminution de la capacité du plasma à inhiber la génération de thrombine. L'une des hypothèses pour expliquer les courbes atypiques de génération de thrombine des rats obèses est que la thrombine, fixée à la fibrine ne peut pas être inhibée par l'AT et continue son auto-amplification. Les taux de fibrinogène étant augmentés chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses nous avons étudié s'il pouvait être en partie envisagé responsable des modifications du profil de génération de thrombine.

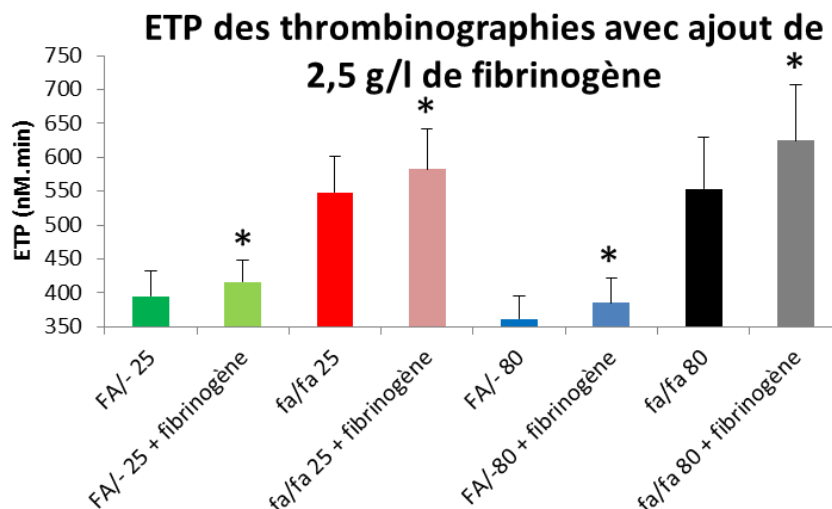
La **figure 41** présente la corrélation faite pour les quatre groupes de rats Zucker entre la génération de thrombine totale réalisée en PDP et les concentrations plasmatique en fibrinogène. La quantité de thrombine générée est corrélée à la concentration plasmatique en fibrinogène. Chez les rats non obèses la corrélation est moins importante que chez les rats obèses. Le fibrinogène est donc plus impliqué dans les variations de la génération de thrombine chez les rats obèses que chez les rats non obèses.



**Figure 41 :** Corrélations entre l'ETP et le fibrinogène. Le r de la corrélation globale est de 0,661.

L'ajout de 2,5 g/l de fibrinogène dans le plasma des rats non obèses pour atteindre la concentration trouvée chez les rats obèses aboutit à une augmentation significative dans les

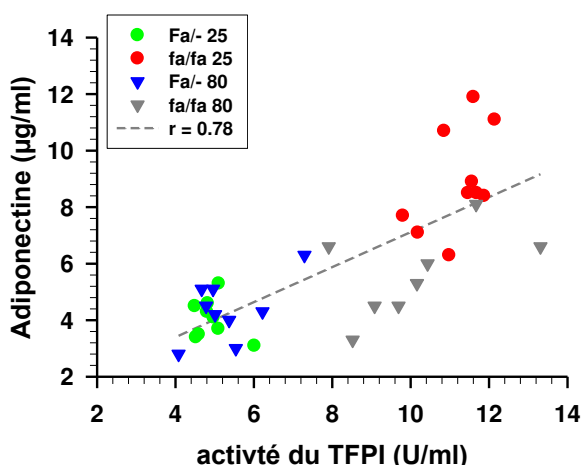
groupes de rats non obèses (**Figure 42**). Cependant, l'augmentation de la génération de thrombine n'est pas suffisante pour atteindre celle trouvée chez les rats obèses du même âge.



**Figure 42 :** Valeur d'ETP dans les PDP de rats Zucker obèses et non obèses. Du fibrinogène (2,5 g/l) a été ajouté dans les PDP. \* p < 0,05 vs même groupe de rats sans ajout de fibrinogène. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. n = 7 à 11 rats par groupe.

### VII.1.8. L'implication des adipokines et des cytokines dans la génération de thrombine

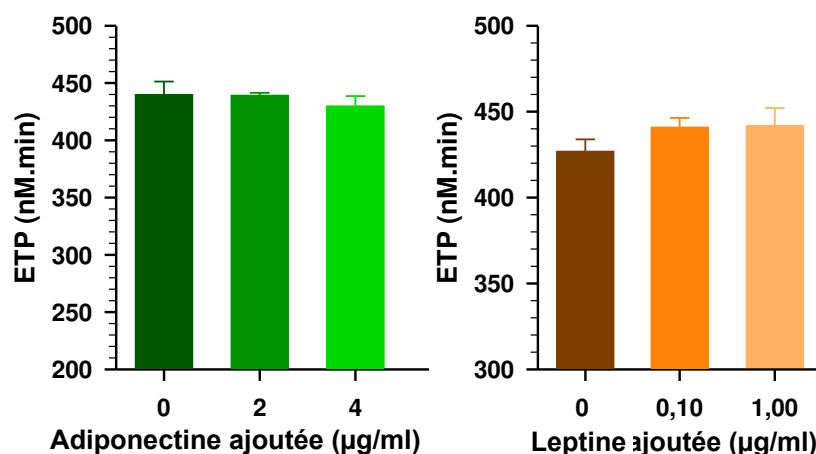
Les adipokines et plus particulièrement l'adiponectine pourraient être impliquées dans le phénotype prothrombotique des rats obèses. En effet, l'adiponectine peut augmenter la synthèse de TFPI tout en diminuant celle de TF<sup>306</sup>. Chez les rats Zucker les concentrations en adiponectine sont d'ailleurs très corrélées à l'activité du TFPI (**Figure 43**).



**Figure 43 :** Corrélations entre l'adiponectine et l'activité du TFPI. Le r de la corrélation du groupe Fa/- 25 est de -0,272, du groupe fa/fa 25 de 0,501, du groupe Fa/- 80 de 0,552 et du groupe fa/fa de 0,784.



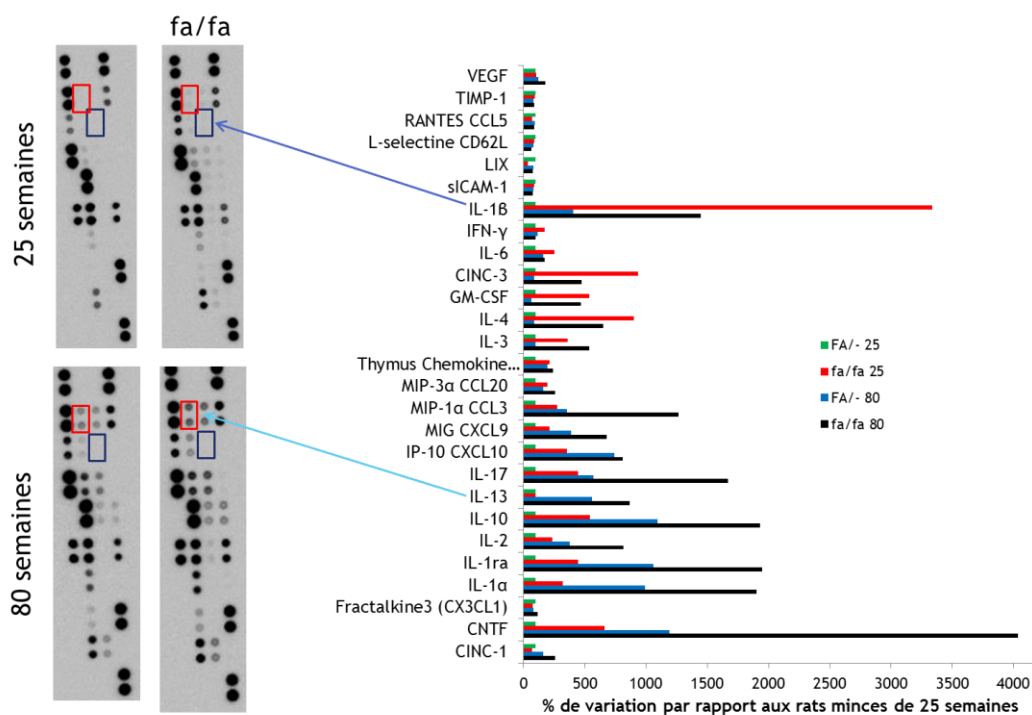
Nous avons ajouté dans le plasma des rats non obèses de l'adiponectine ou une autre adipokine présentée comme pouvant modifier l'hémostase, la leptine (adipokine d'autant plus importante qu'elle est très augmentée chez les rats Zucker), pour atteindre la concentration des rats obèses. Cependant ces adipokines, ajoutées directement dans le plasma, ne permettent pas de modifier l'ETP (**Figure 44**).



**Figure 44 :** Valeurs d'ETP dans les PPP de rats Zucker non obèse avec ajout d'adipokines. De l'adiponectine ou de la leptine ont été ajoutés dans les PDP de rat non obèse. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM.

Un array de cytokines a ensuite été réalisé pour mieux identifier des cytokines impliquées dans le SMet et le vieillissement chez le rat Zucker. Les résultats sont présentés **figure 45**. Chaque membrane a été incubée avec un pool de 8 plasmas d'un même groupe de rat. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux rats non obèses de 25 semaines.

Un certain nombre de cytokines ayant un rôle potentiel dans l'hémostase sont modifiées dans chez les rats obèses ou avec le vieillissement. C'est notamment le cas de l'IL-3 qui stimule la différenciation des mégacaryocytes et qui est augmenté chez les rats obèses aux deux âges. L'IL-1 $\beta$  qui peut fixer le fibrinogène et augmenter son activité suit les mêmes variations qu'IL-3. IL-13 a un profil différent des deux cytokines précédentes puisqu'elle est augmentée avec le vieillissement dans les deux groupes, sans différence à 25 semaines chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses. Cette cytokine diminue la synthèse de fibrinogène.



**Figure 45 :** Array de cytokines chez les rats Zucker âgés de 25 et 80 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux rats non obèses de 25 semaines.

## VII.2. L'Étude de l'hémostase du rat SHR

A cause des résistances périphériques qu'elle engendre, l'hypertension est mise en cause dans l'aggravation de l'IC. Pour explorer les liens existant entre l'hypertension et les altérations de l'hémostase nous avons phénotypé de l'hémostase de rat SHR à 12 semaines, lorsque les rats sont hypertendus, ainsi que de rats de 5 semaines, avant la mise en place de cette hypertension.

### VII.2.1. Les paramètres morphologiques et la numération sanguine

Les paramètres morphologiques et la numération sanguine des rats sont présentés dans le **tableau 14**. Les rats SHR ont une masse moins importante que les rats Wistar à 5 comme à 12 semaines tandis que le nombre d'érythrocytes, l'hématocrite et la concentration en hémoglobine sont plus élevés. Le compte plaquettaire est augmenté chez les rats SHR à 12 semaines par rapport aux rats Wistar. Le volume moyen des plaquettes est plus important chez les rats SHR à 12 semaines par rapport à leurs contrôles.

Age	Wistar	SHR	Wistar	SHR
	5 semaines		12 semaines	
n	10	10	10	10
Poids (g)	141 ± 2	94 ± 5 *	349 ± 8	273 ± 4 *
PAS consciente (mmHg)	131 ± 2	156 ± 9*	143 ± 2	189 ± 4*
Erythrocytes (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,76 ± 0,06	5,21 ± 0,08*	6,02 ± 0,16	7,34 ± 0,03 *
Hématocrite (%)	29,1 ± 0,3	31,0 ± 0,5*	32,2 ± 0,9	36,6 ± 0,3 *
Hémoglobine (g/dl)	9,7 ± 0,2	10,2 ± 0,1*	11,6 ± 0,3	12,8 ± 0,1 *
Plaquettes (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	569 ± 27	531 ± 18	429 ± 21	527 ± 14 *
VMP (µm <sup>3</sup> )	6,2 ± 0,2	6,4 ± 0,2	6,6 ± 0,1	7,9 ± 0,2 *
Leucocytes (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	2,9 ± 0,4	3,4 ± 0,2	3,2 ± 0,3	3,1 ± 0,1

**Tableau 14 :** Paramètres morphologiques et numération sanguine des rats SHR et Wistar de 5 et 12 semaines. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. \* P < 0,05, SHR vs Wistar. PS : pression systolique ; VMP : volume plaquettaire moyen.

### VII.2.2. Les dosages des facteurs de la coagulation

Le **tableau 15** présente les résultats des dosages des facteurs plasmatiques et pariétaux déterminant la réactivité du système de la coagulation. Le FT est diminué et le vWF augmenté chez les rats SHR de 12 semaines par rapport aux rats Wistar du même âge. Le TFPI est augmenté tandis que la prothrombine est diminuée chez les rats SHR par rapport à leurs contrôles à 5 comme à 12 semaines. En ce qui concerne les taux d'AT, de FVIII, ainsi que les complexes TAT, ils ne sont pas différents entre les deux groupes.

Age	Wistar	SHR	Wistar	SHR
	5 semaines		12 semaines	
n	10	10	10	10
FT (pmoles/l)	11,9 ± 1,3	9,7 ± 1,2	3,7 ± 0,8	1,2 ± 0,3 *
TFPI (U/ml)	6,4 ± 0,5	9,5 ± 0,8*	4,5 ± 0,4	6,9 ± 0,2 *
Prothrombine (%)	60 ± 2	53 ± 1*	83 ± 4	58 ± 4 *
AT (%)	124 ± 5	118 ± 5	107 ± 7	100 ± 4
vWF (%)	43 ± 3	45 ± 3	34 ± 2	50 ± 1*
FVIII (%)	234 ± 15	221 ± 32	150 ± 20	120 ± 14
Complexes TAT (ng/ml)	6 ± 1	20 ± 9	53 ± 12	52 ± 10

**Tableau 15 :** Dosage des facteurs de la coagulation des rats SHR. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. \* P < 0,05, SHR vs Wistar. FT : facteur tissulaire ; TFPI : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire ; AT : antithrombine ; vWF : facteur von Willebrand ; FVIII : facteur VIII ; TAT : complexes thrombine/anti-thrombine.

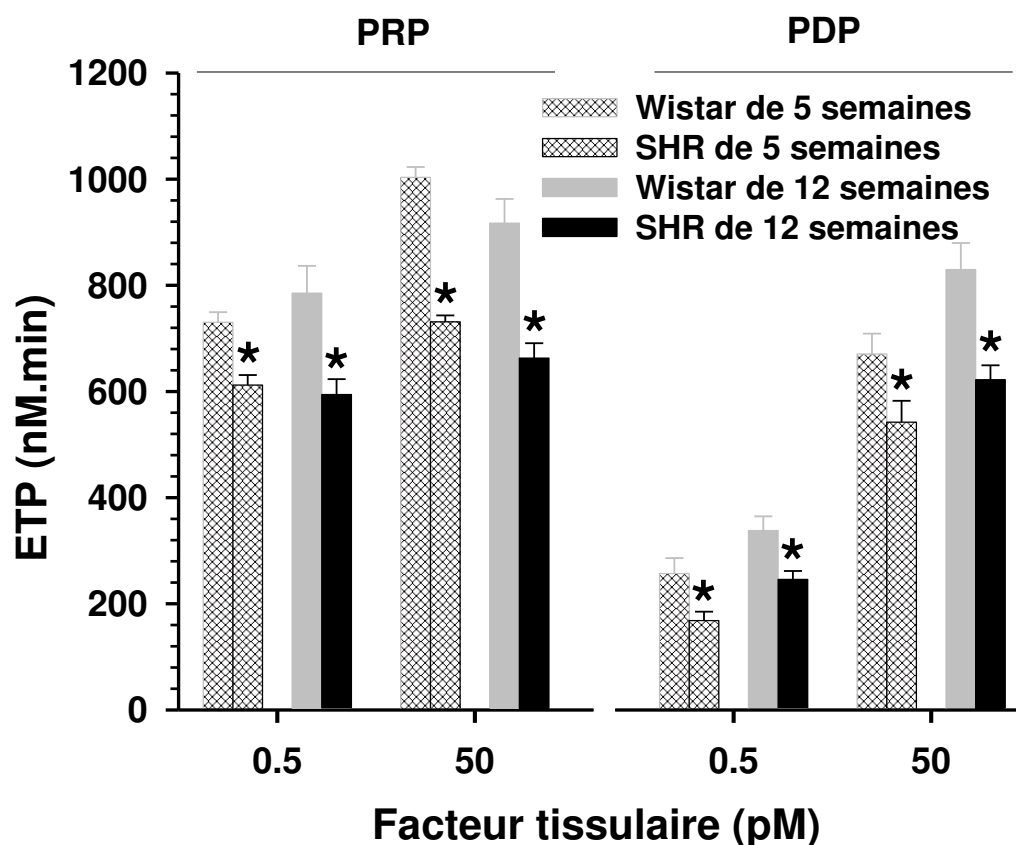
### VII.2.3. La génération de thrombine en PDP et PRP

Les résultats de la génération de thrombine effectuée avec du PDP de rats SHR et Wistar de 5 et 12 semaines est déclenchée avec 0,5 pM de FT sont présentés **tableau 16**. Seule la quantité totale de thrombine générée est différente, avec une diminution significative chez les rats SHR par rapport aux rats Wistar aux deux âges.

Age	Wistar	SHR	Wistar	SHR
	5 semaines		12 semaines	
n	10	7	18	23
Temps de latence (min)	7,5 ± 1,6	6,9 ± 1,7	3,8 ± 0,3	4,6±0,5
Pic de thrombine (nM)	59 ± 10	42 ± 10	59 ± 9	56 ± 5
Temps pour atteindre le pic (min)	10,6 ± 1,7	10,6 ± 1,0	8,1 ± 0,4	8,1 ± 0,5
Vélocité (nM/min)	18 ± 3	14 ± 4	16 ± 2	17 ± 2
ETP (nM.min)	257 ± 29	168 ± 17*	338 ± 27	246 ± 16*

**Tableau 16 :** Génération de thrombine chez les rats SHR. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. \* P < 0,05, SHR vs Wistar. ETP : endogenous thrombin potential, FT: facteur tissulaire.

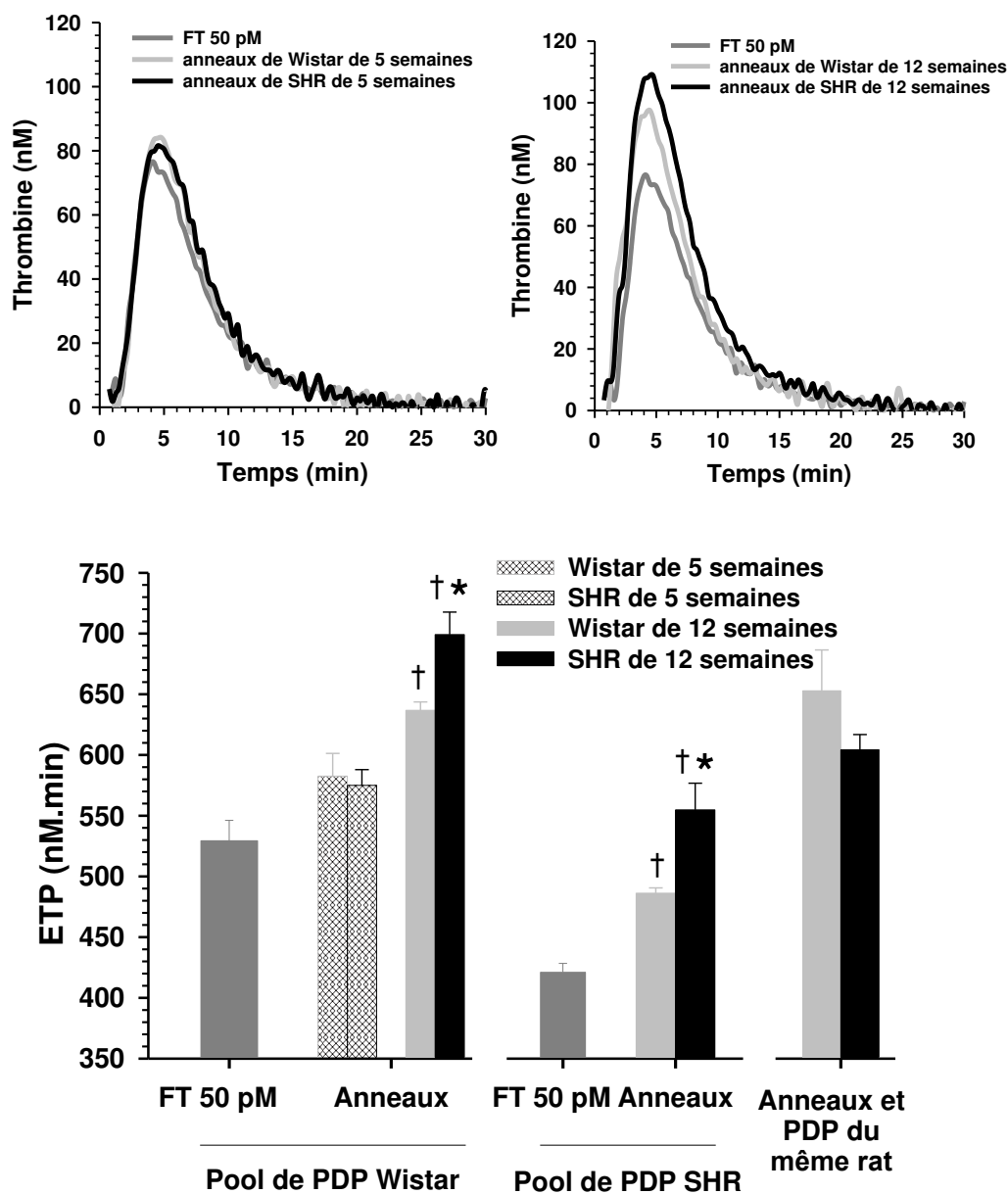
La génération de thrombine réalisée en PRP et déclenchée avec 5 ou 50 pM de FT (cette concentration élevée est utilisée pour atteindre la même concentration en FT que celle relarguée par les anneaux aortiques) montre la même diminution de la thrombine totale générée chez les rats SHR par rapport aux rats Wistar (**Figure 46**).



**Figure 46 :** Valeur d'ETP dans les PRP et PDP, en réponse à une stimulation par du FT, des rats SHR et Wistar de 5 et 12 semaines. \* P < 0,05, SHR vs Wistar. ETP : endogenous thrombin potential ; PRP : plasma riche en plaquettes ; PDP : plasma dépourvu en plaquettes

#### VII.2.4. La génération de thrombine à la surface des anneaux aortiques

La génération de thrombine a été enregistrée à la surface d'anneaux aortiques de 2 mm pour étudier la capacité de la paroi vasculaire à générer de la thrombine. Les résultats sont présentés **figure 47**. La génération de thrombine est augmentée chez les rats SHR de 12 semaines par rapport aux rats Wistar du même âge en utilisant un pool de PDP de rat Wistar ou un pool de PDP de rat SHR. L'utilisation d'un pool de PDP permet de s'affranchir des variations de génération de thrombine liées à des facteurs plasmatiques et donc de comparer l'influence propre des anneaux. Cette différence n'existe pas lorsque les rats ne sont pas encore hypertendus. La mesure de génération de thrombine en utilisant les anneaux aortiques et le plasma du même rat ne montre pas de différence entre les rats SHR et les rats Wistar.

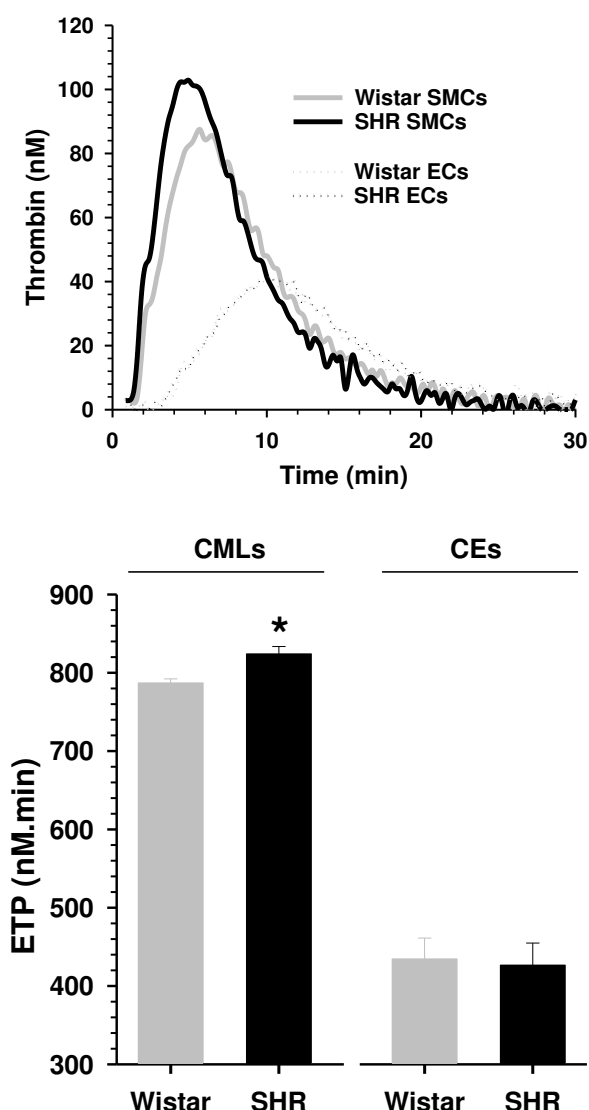


**Figure 47 :** Courbes représentatives de génération de thrombine et valeurs d'ETP à la surface d'anneaux aortiques de rats SHR et Wistar ajouté à un pool de PDP de rats Wistar ou SHR. \* P < 0,05, SHR vs Wistar. † P < 0,05, génération de thrombine avec anneaux vs génération de thrombine en PDP. ETP : endogenous thrombin potential. PDP : plasma dépourvu en plaquettes. N = 8 par groupe.

### VII.2.5. La génération de thrombine à la surface des cellules vasculaires

Pour évaluer les implications respectives des différents types cellulaires de la paroi artérielle dans le phénotype observé avec des anneaux, la génération de thrombine a été enregistrée à la surface de CML ou de CE de rats SHR et Wistar de 12 semaines (**Figure 48**). Il n'y a pas de différence ni dans la cinétique, ni dans la quantité de thrombine générée à la surface de CE de

rats SHR et Wistar. La génération de thrombine à la surface des CML de rats SHR est significativement augmentée par rapport aux rats Wistar. Comme décrit dans la littérature, les CML permettent de générer une quantité de thrombine plus importante que les CE.



**Figure 48 :** Courbes représentatives de génération de thrombine et ETP des générations de thrombine réalisée à la surface de CML et de CE de rats SHR et Wistar de 12 semaines. La génération de thrombine a été réalisée en utilisant un pool de PDP de rats Wistar. \*  $P < 0,05$ , SHR vs Wistar. ETP : endogenous thrombin potential ; CML : cellules musculaires lisses ; CE : cellules endothéliales.  $N = 12$ .

### VII.3. Le phénotypage de l'hémostase des modèles activant le couple aldostérone/MR

Le rôle du système RAA est central dans le développement et le cercle vicieux qui caractérise l'IC. Il pourrait avoir un rôle dans l'hémostase en agissant sur l'état de la paroi vasculaire, qui joue un rôle majeur dans la survenue d'événements thrombotiques. L'autre élément qui peut

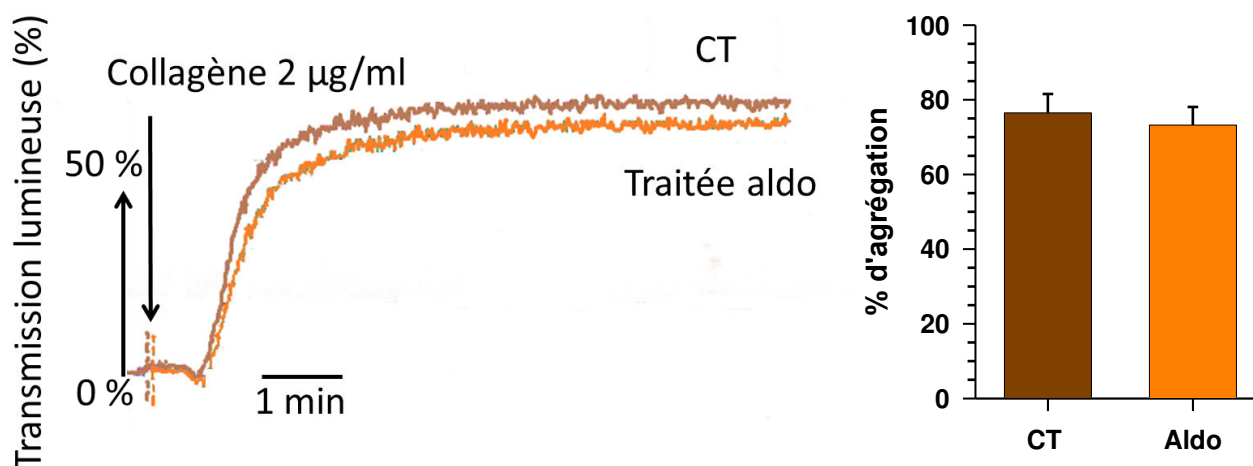


permettre de penser que l'aldostérone est important dans l'hémostase, est que le traitement par un antagoniste du récepteur à l'aldostérone de patients présentant une IC diminue le risque de mortalité cardiovasculaire qui inclut le risque de thrombose. Pour explorer le rôle du système RAA dans l'hémostase nous avons traité des souris avec 60  $\mu\text{g}$  d'aldostérone/kg/jours pendant 3 semaines. Nous avons également utilisé des souris surexprimant le MR de manière conditionnelle dans l'endothélium qui ont une augmentation de leur PA qui est indépendante du rôle de l'aldostérone sur le rein.

### VII.3.1. L'étude de l'hémostase des souris traitées à l'aldostérone

#### VII.3.1.1. L'agrégation plaquettaire

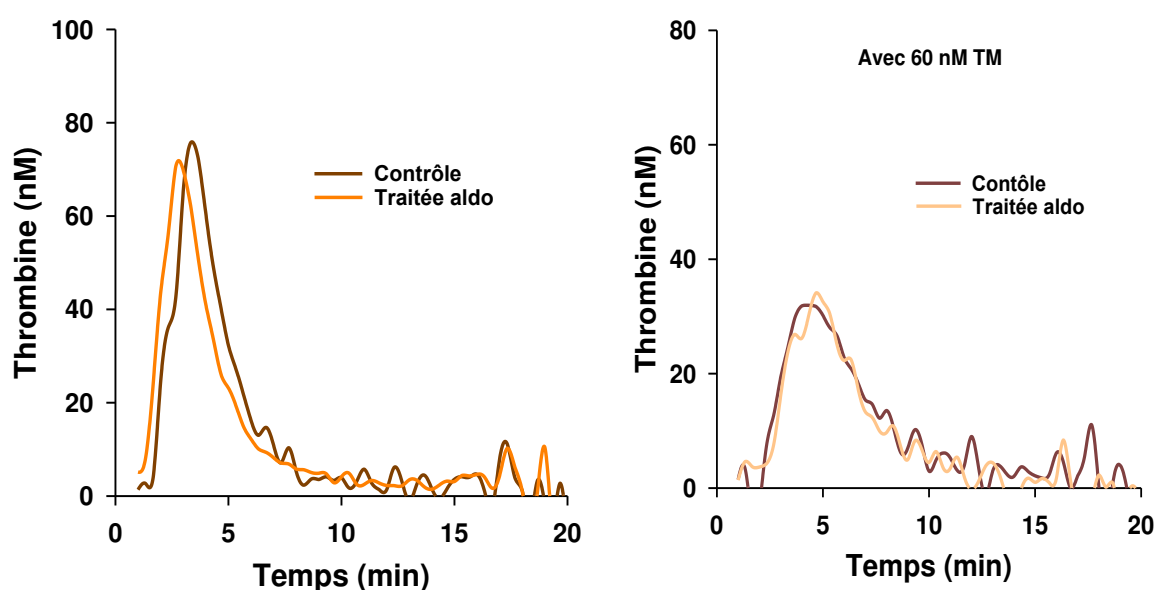
L'agrégation plaquettaire a été étudiée en plaquettes lavées resuspendues en tampon Tyrode et ajustées à 200 giga/l ( $10^3/\text{mm}^3$ ) (**Figure 49**). L'agrégation a été déclenchée par 2 ou 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de collagène. Aucune différence n'a été observée entre les souris traitées à l'aldostérone et les souris contrôles pour les différents paramètres mesurés.



**Figure 49 :** Courbes d'agrégation plaquettaire et valeurs d'agrégation maximale des plaquettes de souris traitées à l'aldostérone. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. Aldo : aldostérone. CT, n = 7, traitée aldo, n = 8.

### VII.3.1.2. La génération de thrombine en PDP

La **figure 50** présente les résultats de la thrombinographie en PDP avec et sans ajout de 60 nM de TM des souris traitées à l'aldostérone. L'ajout de TM permet d'estimer la réactivité du système anticoagulant de la PCa. L'endothélium qui joue un rôle crucial pour ce système n'étant pas présent dans le milieu réactionnel, il est nécessaire d'ajouter de la TM pour que la thrombine générée puisse activer de façon efficace la PC en PCa. La réactivité du système de la coagulation n'est pas différent entre les souris traitées et les contrôles avec ou sans ajout de TM.

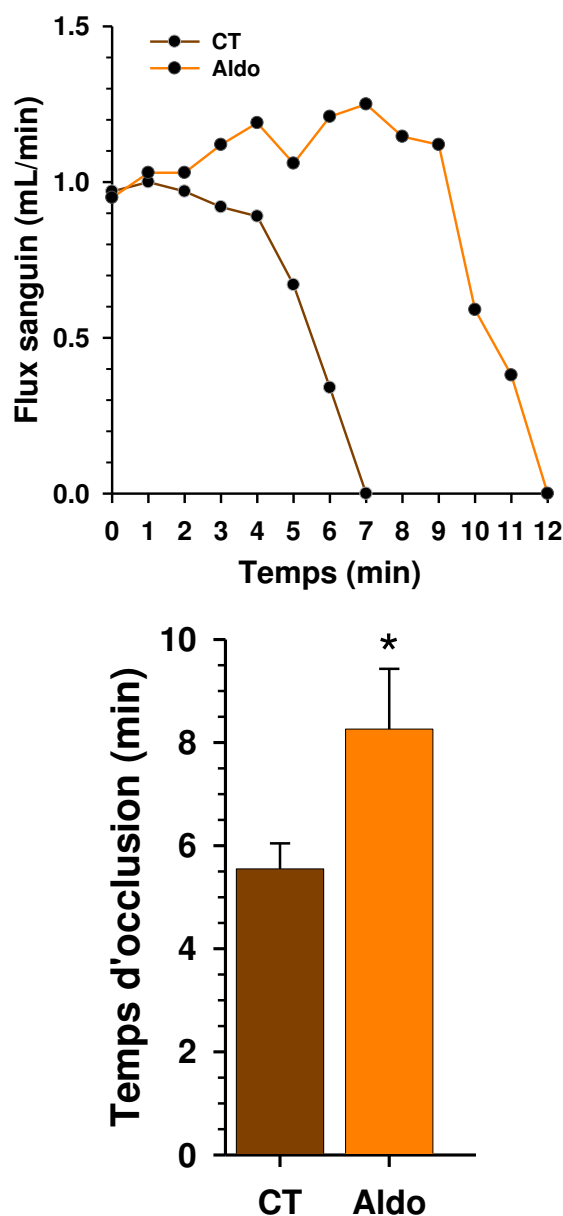


	sans TM		TM 60 nM	
	NT	Traitées aldo	NT	Traitées aldo
ETP (mM.min)	253 ± 8	255 ± 17	153 ± 13	177 ± 32
Temps de latence (min)	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,2
Pic de thrombine (nM)	86 ± 5	85 ± 6	33 ± 5	38 ± 8
Temps pour atteindre le pic (min)	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,2	5,3 ± 0,5	5,2 ± 0,8
Vélocité (nM/min)	50 ± 4	50 ± 4	12 ± 3	15 ± 4
srTM			0,60 ± 0,08	0,74 ± 0,10

**Figure 50 :** Thrombinographie en PDP avec et sans TM, et paramètres de thrombinographie des souris traitées à l'aldostérone. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. NT : non traitées ; Aldo : aldostérone ; ETP : endogenous thrombin potential, srTM : ratio de sensibilité à la thrombomoduline calculée en divisant l'ETP des souris traitées à l'aldostérone par l'ETP des souris non traitées. Le srTM permet de connaître la réactivité au système de la PCa d'un plasma. CT, n = 7, traitée aldo, n = 8.

### VII.3.1.3. Le modèle de thrombose carotidienne des souris traitées à l'aldostérone

Un modèle de thrombose par application de chlorure ferrique sur la carotide droite a été étudié, les résultats sont présentés **figure 51**. La diminution du flux se fait de façon cyclique avant l'occlusion totale du vaisseau. Les souris traitées à l'aldostérone présentent un allongement significatif du temps pour occlure totalement le vaisseau.



**Figure 51 :** Courbe de flux sanguin dans la carotide droite et temps d'occlusion dans un modèle de thrombose chez les souris traitées à l'aldostérone. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM. \* P < 0,05 vs contrôle. NT : non traitées, Aldo : aldostérone. CT, n = 10, traitée aldo, n = 7.

### VII.3.2. L'étude de l'hémostase des souris RM-CE

#### VII.3.2.1. La numération sanguine des souris RM-CE

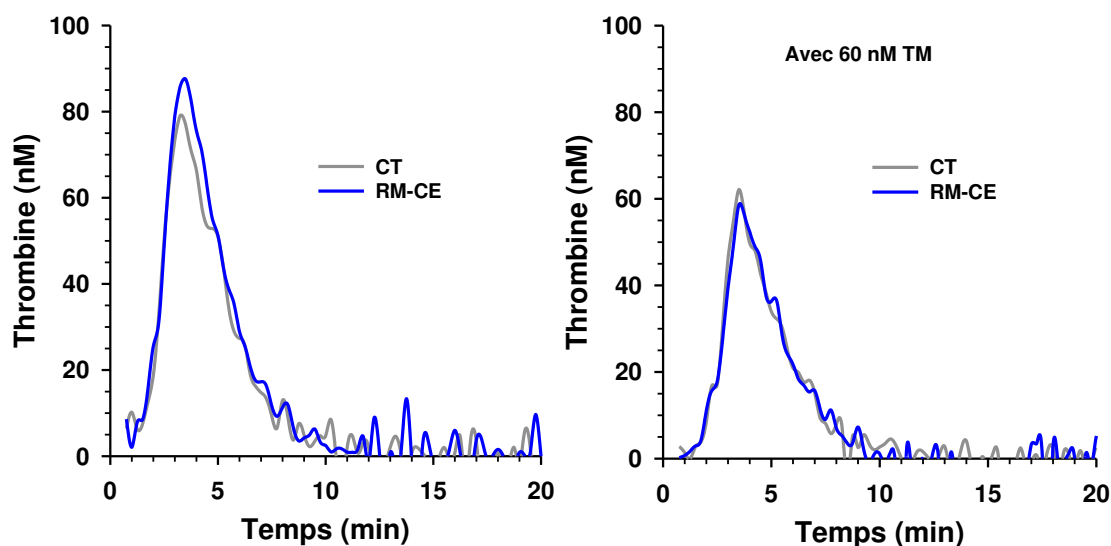
Le **tableau 17** présente la numération sanguine des souris RM-EC et des souris contrôles. Aucune différence n'est observée entre les deux groupes.

	CT	RM-CE	P
Erythrocytes ( $10^6/\text{mm}^3$ )	$7,2 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,3$	0,82
Hématocrite (%)	$33,6 \pm 0,5$	$35,0 \pm 0,8$	0,20
Hémoglobine (g/dl)	$10,5 \pm 0,2$	$10,5 \pm 0,3$	0,98
Plaquettes ( $10^3/\text{mm}^3$ )	$1038 \pm 96$	$900 \pm 112$	0,37
VMP ( $\mu\text{m}^3$ )	$7,0 \pm 0,4$	$6,4 \pm 0,4$	0,31
Leucocytes ( $10^3/\text{mm}^3$ )	$5,5 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,6$	0,22

**Tableau 17 :** Numération sanguine des souris RM-CE. CT : contrôle ; RM-CE : souris surexprimant le récepteur minéralocorticoïde dans les cellules endothéliales. VMP : volume plaquettaire moyen. CT, n = 8, RM-CE, n = 7.

### VII.3.2.2. La génération de thrombine en PDP

La thrombinographie pour les souris RM-CE a été réalisée en PDP avec et sans ajout de 60 nM de TM (**Figure 52**). La réactivité du système de la coagulation en PDP n'est pas différent entre les souris RM-CE et les contrôles avec ou sans ajout de TM.

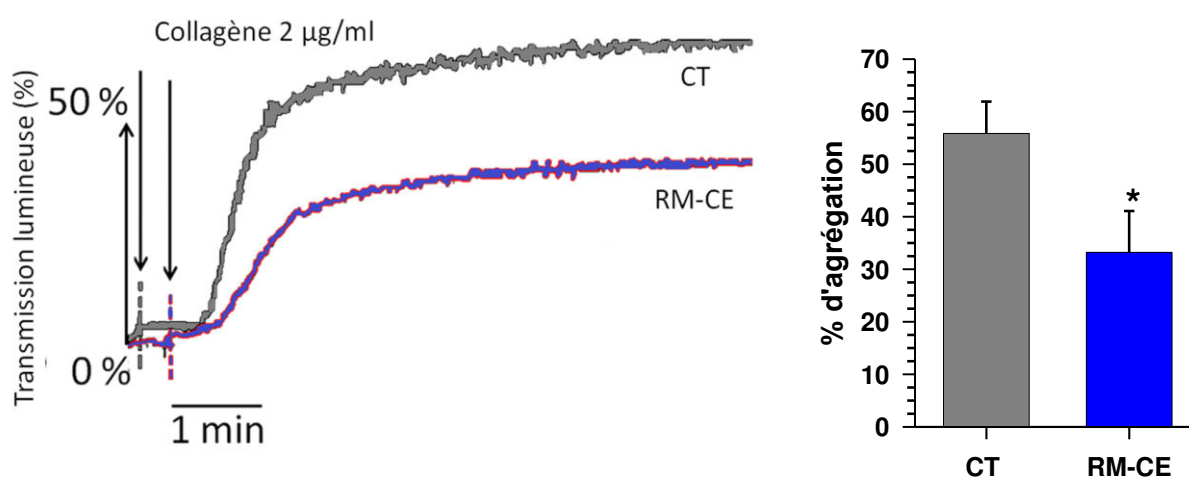


	sans TM		TM 60 nM	
	Contrôle	RM-CE	Contrôle	RM-CE
ETP (mM.min)	302 ± 11	304 ± 6	236 ± 26	235 ± 16
Temps de latence (min)	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,1 ± 0,2
Pic de thrombine (nM)	86 ± 4	87 ± 3	63 ± 6	60 ± 4
Temps pour atteindre le pic (min)	3,4 ± 0,2	3,5 ± 0,1	4,4 ± 0,4	4,2 ± 0,3
Vélocité (nM/min)	48 ± 4	44 ± 3	31 ± 4	30 ± 3
srTM			0,75 ± 0,04	0,77 ± 0,05

**Figure 52 :** Thrombinographie en PDP avec et sans TM, et paramètres de thrombinographie des souris RM-CE. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. ETP : endogenous thrombin potential, srTM : ratio de sensibilité à la thrombomoduline calculée en divisant l'ETP des souris traitées à l'aldostérone par l'ETP des souris non traitées; CT : contrôle ; RM-CE : souris surexprimant le récepteur minéralocorticoïde dans les cellules endothéliales.

### VII.3.2.3. L'agrégation et la sécrétions plaquettaire

La **figure 53** présente les résultats de l'agrégation plaquettaire réalisée en plaquettes lavées des souris RM-CE. L'agrégation a été déclenchée par 2 ou 5 µg/ml de collagène. Une diminution de l'agrégation plaquettaire est observée chez les souris RM-CE par rapport aux souris contrôles. La sécrétion plaquettaire a également été évaluée en dosant l'ATP et le TXB<sub>2</sub>. Il n'y a pas de modifications des quantités d'ATP et de TXB<sub>2</sub> relarguées.



	CT	MR-EC	P
	n = 8	n = 5	
ATP (nM)	25,8 ± 4,4	23,2 ± 3,7	0,68
TXB <sub>2</sub> (pg/ml)	21,8 ± 3,3	28,5 ± 5,8	0,29

**Figure 53 :** Courbes d'agrégation plaquettaire, agrégation maximale et dosages des sécrétions plaquettaires des RM-CE. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. \* P < 0,05 vs contrôle. CT : contrôle ; RM-CE : souris surexprimant le récepteur minéralocorticoïde dans les cellules endothéliales ; ATP : adénosine triphosphate ; TXB<sub>2</sub> : thromboxane B<sub>2</sub>.

### VII.3.2.4. Les dosages de protéines plasmatiques et aortiques impliquées dans le système de la coagulation

Nous avons cherché à savoir quelles protéines de la coagulation pouvait être impliquées dans le phénotype anti-thrombotique observé chez les souris RM-CE. Pour cela, différentes protéines ont été dosées dans le plasma et les cellules aortiques pour explorer l'état inflammatoire et de la coagulation des souris (**Tableau 18**). Le vWF, les CD 146, ICAM et VCAM solubles ont été dosés pour renseigner sur l'état de l'endothélium. L'EPCR et ADAM 17 ainsi que la TM ont été dosés pour explorer le système anticoagulant de la PC. Le TFPI à lui été dosé pour savoir si d'autres voies anticoagulantes pouvaient être impliquées dans le phénotype des souris.

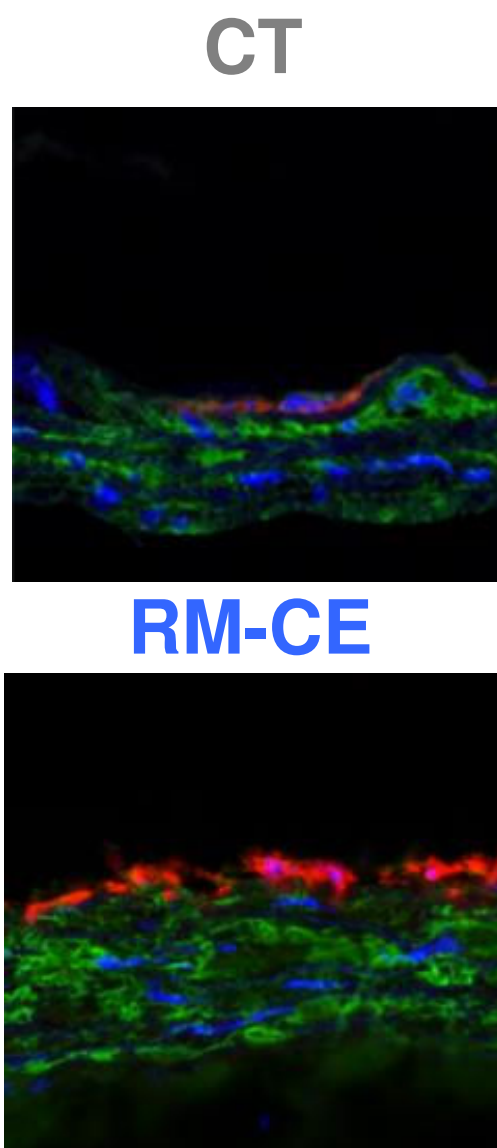
Une augmentation significative du vWF observée chez les souris RM-CE. L'EPCR quant à lui, est trouvé augmenté dans les protéines aortiques.

	<b>Contrôle</b> <b>n = 12</b>	<b>RM-CE</b> <b>n = 14</b>
<b>Plasma</b>		
vWF (ng/ml)	658 ± 101	1006 ± 115*
sCD146, DO (450mn)	0,66 ± 0,04	0,69 ± 0,07
sICAM-1 (ng/ml)	4,2 ± 0,2	4,4 ± 0,4
sVCAM-1 (ng/ml)	7,9 ± 0,4	8,5 ± 0,7
TFPI (U/ml)	3,5 ± 0,3	3,2 ± 0,4
sTM (ng/ml)	1,24 ± 0,10	1,06 ± 0,08
sEPCR (ng/ml)	22 ± 5	17 ± 3
<b>Protéines aortiques</b>		
TM (ng/ml)	2,1 ± 0,2	2,3 ± 0,4
EPCR (ng/ml)	13,5 ± 0,4	15,7 ± 0,8*
ADAM17 (ng/ml)	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1

**Tableau 18 :** ELISA des marqueurs endothéliaux des souris RM-CE. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. \* P < 0,05 vs contrôle. RM-CE : souris surexprimant le récepteur minéralocorticoïde dans les cellules endothéliales. ; vWF : facteur von Willebrand ; ICAM : molécule 1 d'adhérence intercellulaire ; VCAM : molécule 1 d'adhérence vasculaire ; TFPI : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire ; TM : thrombomoduline ; EPCR : récepteur endothélial de la protéine C, ADAM17 : métalloprotéinase ADAM domaine 17.

### VII.3.2.5. Expression du récepteur de la PC (EPCR) par microscopie confocale

L'EPCR a été caractérisé par microscopie confocale sur des cryo-sections d'aorte (**Figure 54**). En rouge l'EPCR, en bleu les noyaux cellulaires colorés au DAPI, en vert les lames d'élastine. L'EPCR est exprimé uniquement au niveau des CE. Une augmentation de l'expression de l'EPCR est visible chez les souris RM-CE.

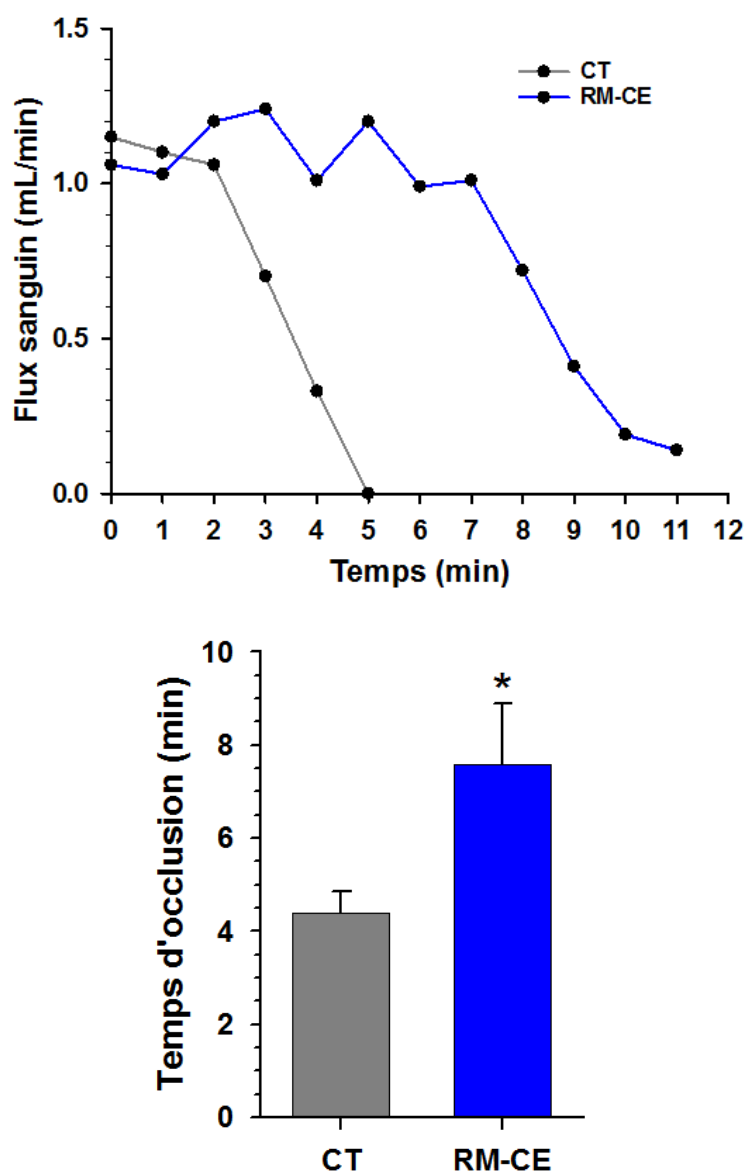


**Figure 54 :** Immunohistochimie de l'EPCR sur les coupes aortiques des souris RM-CE. CT : contrôle ; RM-CE : souris surexprimant le récepteur minéralocorticoïde dans les cellules endothéliales.



### VII.3.2.6. Le modèle de thrombose carotidienne des souris RM-CE

La **figure 55** présente les résultats d'un modèle de thrombose par application de chlorure ferrique sur la carotide droite. La diminution du flux se fait de façon cyclique avant l'occlusion totale du vaisseau. De la même manière que pour les souris traitées à l'aldostérone, les souris surexprimant le RM au niveau de l'endothélium présentent un allongement significatif du temps d'occlusion.



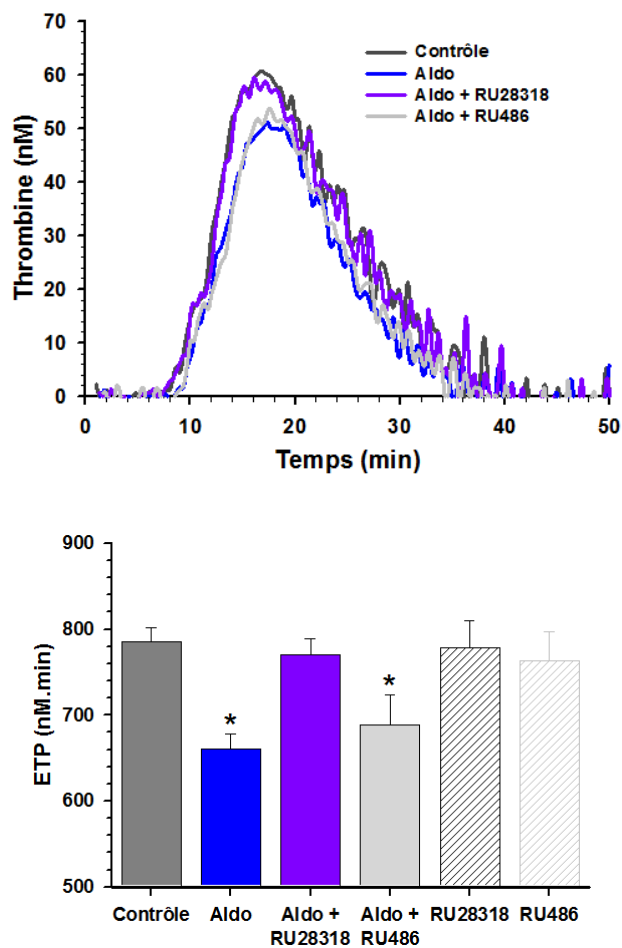
**Figure 55 :** Courbes de flux sanguin et temps d'occlusion dans un modèle de thrombose chez les souris RM-CE. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM. \* P < 0,05 vs contrôle. CT : contrôle ; RM-CE : souris surexprimant le récepteur minéralocorticoïde dans les cellules endothéliales. CT, n = 4, RM-CE, n = 6.

#### **VII.4. Les HAECs traitées à l'aldostérone**

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le phénotype anti-thrombotique observé chez les souris RM-CE nous avons choisi d'utiliser un modèle cellulaire : des HAECs traitées à l'aldostérone.

##### **VII.4.1. La génération de thrombine à la surface des HAEC traitées à l'aldostérone**

La **figure 56** et le **tableau 19** présentent les résultats des thrombinographies réalisées sur les HAECs traitées 24 h avec  $10^{-8}$  M d'aldostérone ou  $10^{-6}$  M d'antagonistes du RM ou du RG. L'utilisation d'un antagoniste du RG est nécessaire puisque l'aldostérone peut fixer le RG. Il est donc nécessaire de vérifier que l'effet du traitement des CE par l'aldostérone dépend du RM et non du RG. La génération de thrombine à la surface des CE traitées à l'aldostérone est significativement plus faible qu'à la surface des cellules contrôles. Il en va de même pour les cellules traitées avec un anti-RG mais pas un anti-RM. Les différents paramètres permettant de quantifier la génération de thrombine sont diminués dans le groupe des cellules traitées à l'aldostérone. Aucune différence n'est observée par rapport au contrôle lors de l'utilisation d'anti-RM et anti-RG seuls.



**Figure 56 :** Génération de thrombine à la surface des HAECs. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $P < 0,05$  vs contrôle. ETP : endogenous thrombin potential ; Aldo : aldostérone. N = 9 à 12 par groupe.

RESULTATS

	Contrôle	Aldostérone	Aldostérone + RU28318	Aldostérone + RU486	Contrôle + RU28318	Contrôle + RU486
ETP (nM.min)	785 ± 17	661 ± 17*	770 ± 19	688 ± 35*	778 ± 32	763 ± 33
Temps de latence (min)	10,6 ± 0,3	11,2 ± 0,3*	10,8 ± 0,2	11,3 ± 0,3*	10,8 ± 0,4	10,6 ± 0,5
Pic de thrombine (nM)	59 ± 2	51 ± 1*	60 ± 2	54 ± 1*	61 ± 2	58 ± 2
Temps pour atteindre le pic (min)	17,1 ± 0,3	17,9 ± 0,3*	17,4 ± 0,2	18,1 ± 0,5*	17,3 ± 0,5	16,8 ± 0,6
Vélocité (nM/min)	9,4 ± 0,3	8,6 ± 0,3*	9,2 ± 0,5	8,7 ± 0,3*	9,9 ± 0,6	9,9 ± 0,2

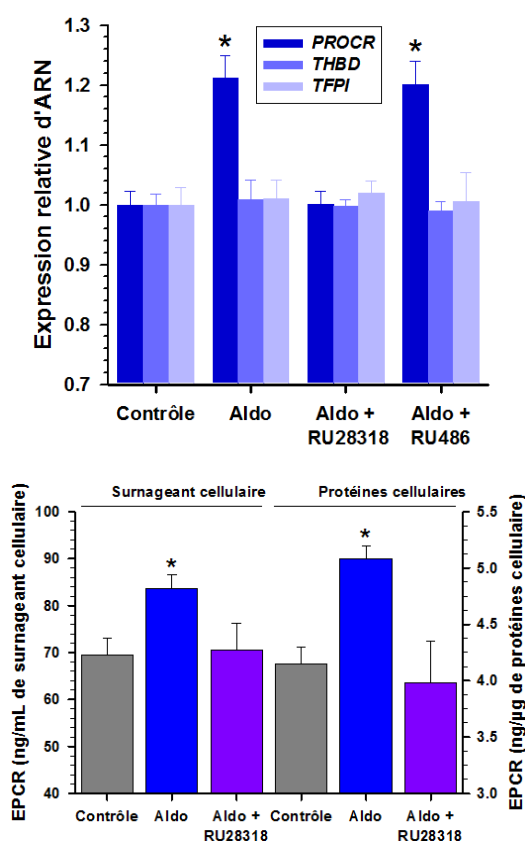
**Tableau 19 :** Paramètres de courbes de génération de thrombine à la surface des HAECs. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM.

\* P < 0,05 vs contrôle. N = 9 à 12 par groupe.

#### VII.4.2. La quantification des protéines anticoagulantes de l'endothélium

Les expressions de l'ARN de l'EPCR, de la TM et du TFPI ont été quantifiées par PCR quantitative (**Figure 57**). Seule l'expression d'EPCR est significativement augmentée au niveau des HAECs traitées à l'aldostérone ou avec un anti-RG. Un antagoniste du RM bloque cette augmentation.

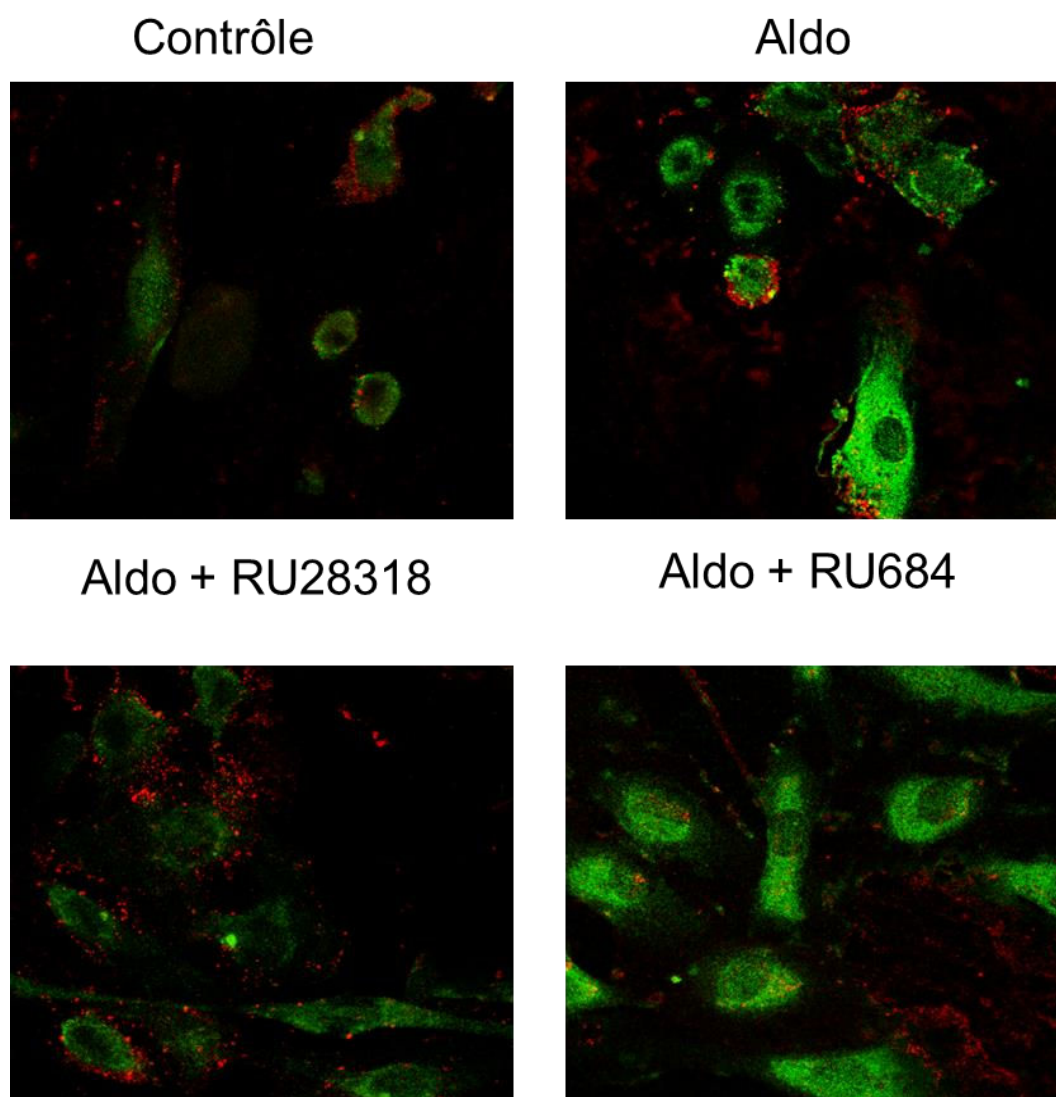
En ce qui concerne la quantification de l'EPCR, un test ELISA a permis de montrer que la quantité d'EPCR présente au niveau des HAECs est augmentée lorsque ces dernières sont traitées à l'aldostérone (**Figure 57**). De plus cette augmentation existe à la fois au niveau de l'EPCR relargué par les cellules dans le milieu de culture qu'au niveau des protéines cellulaires. Ces augmentations sont inhibées lorsque les cellules sont traitées avec un antagoniste du RM.



**Figure 57 :** Quantification de l'expression de l'ARN et des protéines anticoagulantes par les HAECs traitées à l'aldostérone. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $P < 0,05$  vs contrôle. Aldo : aldostérone ; THBD : gène de la thrombomoduline ; PROCR : gène du récepteur à la protéine C ; TFPI : gène de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire. N = 3 en triplicate par groupe.

### VII.4.3. Expression de l'EPCR et la thrombomoduline dans les HAECs

L'EPCR (en vert) et la TM (en rouge) ont été mis en évidence à la surface des HAECs par immunocytochimie (**Figure 58**). Dans des conditions normales (sans activation du système de la PC) les deux protéines ne sont pas colocalisées. Les cellules traitées à l'aldostérone ou avec un antagoniste du RG présentent une augmentation d'EPCR, mais pas de TM, à leur surface. Il n'y a en revanche pas de différence par rapport au contrôle lorsque les cellules sont traitées à l'aldostérone en présence d'un anti-RM



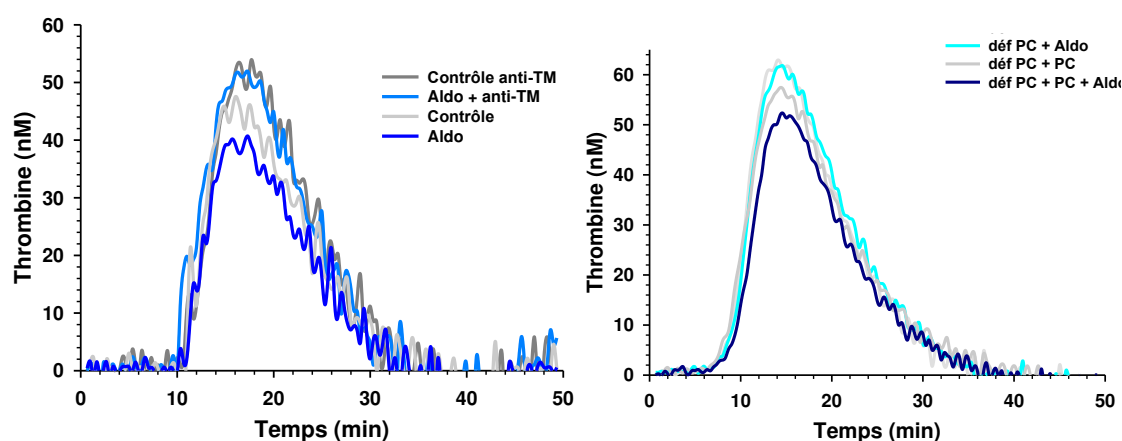
**Figure 58 :** Immunocytochimie pour l'EPCR et la TM à la surface des HAECs traitées à l'aldostérone.

#### VII.4.4. L'implication du système de la PCa

L'augmentation de l'EPCR suggère que le système de la PC pourrait être modifié. Pour explorer ces modifications nous avons réalisé deux types d'expériences (**Figure 59**):

- Nous avons bloqué l'activation de la PC par addition d'un anti-TM, puisque la TM est indispensable à la conversion rapide de PC en PCa nécessaire dans l'inhibition de la génération de thrombine.
- Nous avons également utilisé un plasma sans PC et contrôlé que l'ajout de PC restaure le phénotype.

Dans les deux cas, la génération de thrombine, qui était diminuée lorsque les CE étaient traitées avec l'aldostérone, n'est plus modifiée. Au niveau des expériences avec le plasma déficient en PC l'ajout de 1 U/ml de PC restaure le phénotype, à savoir une diminution de génération de thrombine en réponse à un traitement par l'aldostérone.

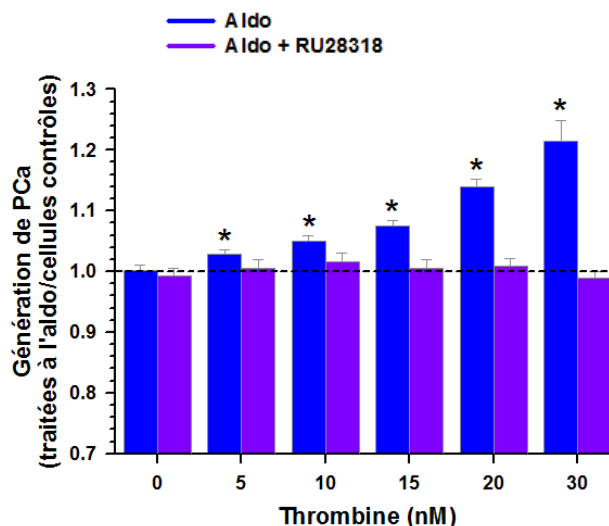


**Figure 59 :** Courbe de génération de thrombine à la surface de CE traitées et non traitées à l'aldostérone en présence d'un anti-TM ou avec un plasma déficient en PC. Aldo : aldostérone ; déf : déficient. N = 3 en triplicate par groupe.

#### VII.4.5. La mesure de la conversion de PC en PCa

Nous avons ensuite mesuré la capacité des HAECs à activer de la PC à l'aide d'un test colorimétrique pour évaluer l'effet fonctionnel du traitement des HAEC avec de l'aldostérone. Les résultats sont présentés **figure 60**. Les résultats sont présentés en rapport par rapport aux cellules contrôles du fait de la très grande variation de la génération de PCa en fonction de la

concentration de thrombine utilisée. Les cellules traitées à l'aldostérone ont une plus grande capacité que les cellules contrôles à convertir de la PC en PCa et ce de manière concentration-en-thrombine dépendante (en bleu). Cette capacité est inhibée lorsque les cellules sont traitées par un antagoniste du RM.



**Figure 60 :** Mesure de la conversion de PC en PCa à la surface des HAECs. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $P < 0,05$  vs contrôle. Aldo : aldostérone ; PCa : protéine C activée. N = 9 à 12.

## **VII.5. L'étude de la rigidité artérielle de la cohorte humaine : l'étude EPHESUS**

L'ajout d'un traitement bloquant le récepteur de l'aldostérone chez des patients présentant une IC en plus des traitements conventionnels augmente leurs chances de survie. Certaines études ont également montré un effet bénéfique des traitements antiagrégants plaquettaires sur la survenue de thrombose dans un contexte d'IC. La cohorte EPHESUS est donc une population de choix pour envisager une étude de l'hémostase chez des patients avec IC.

### **VII.5.1. Les paramètres généraux**

Les informations concernant la cohorte EPHESUS et ses sous-groupes sont résumés dans le **tableau 20**. Les patients hypertendus sont plus âgés, avec une FEVG plus élevées, une fréquence d'hospitalisations plus importantes, un taux de créatinine également plus important, ainsi qu'un eGFR diminué, par rapport au groupe contrôle non hypertendus. Ces variations sont également trouvées dans le sous-groupe où la VOP a été mesurée mais n'atteignent pas la significativité du fait d'un effectif plus faible.



	Population globale			Etude VOP		
	Pas d'HT	HT	tous	Pas d'HT	HT	tous
<b>N</b>	2381	4232	6613	114	192	306
<b>groupe éplérénone</b>	1202 (50)	2106 (50)	3308 (50)	61 (54)	86 (45)	147 (48)
<b>âge (années)</b>	61 ± 12	65 ± 11***	64 ± 12	58 ± 11	63 ± 10***	61 ± 11
<b>sexe : homme</b>	1903 (90)	2799 (66)***	4702 (71)	93 (82)	132 (69)	225 (74)
<b>femme</b>	478 (20)	1433 (34)***	1911 (29)	21 (18)	60 (31)*	81 (28)
<b>pression artérielle (mmHg)</b>	111 ± 12	124 ± 17***	119 ± 17	109 ± 11	123 ± 15***	118 ± 16
<b>- systolique</b>						
<b>- diastolique</b>	68 ± 9	74 ± 11***	72 ± 11	70 ± 8	77 ± 9***	74 ± 9
<b>- moyenne</b>	83 ± 9	91 ± 12***	88 ± 11	83 ± 8	92 ± 10***	89 ± 10
<b>- pulsée</b>	43 ± 10	49 ± 14***	47 ± 13	39 ± 9	47 ± 13***	44 ± 12
<b>fréquence cardiaque (bpm)</b>	75 ± 12	75 ± 12	75 ± 12	74 ± 10	71 ± 9*	72 ± 9
<b>FEVG (%)</b>	32,8 ± 6,1	33,3 ± 6,0**	33,1 ± 6,1	34,2 ± 5,5	34,5 ± 5,1	34,4 ± 5,2
<b>VOP (m/s)</b>				11,4 ± 3,0	12,4 ± 3,2**	12,0 ± 3,1
<b>antécédent d'hospitalisation pour IC</b>	135 (6)	375 (9)***	510 (8)	1 (2)	13 (7)	15 (5)
<b>symptômes d'IC</b>	1255 (53)	1740 (41)***	2995 (45)	53 (46)	75 (39)	128 (42)
<b>Thérapie de reperfusion/revascularisation</b>	2031 (86)	3534 (84)	5565 (85)	107 (94)	174 (98)	281 (97)
<b>potassium (mmol/l)</b>	4,3 ± 0,4	4,3 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,4 ± 0,5	4,4 ± 0,5	4,4 ± 0,5
<b>créatinine (µmol/l)</b>	96 ± 25	102 ± 30***	100 ± 29	94 ± 24	98 ± 26	97 ± 26
<b>eGFR (ml/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>	75 ± 23	68 ± 23***	70 ± 23	77 ± 20	71 ± 23**	73 ± 22
<b>antécédents d'infarctus du myocarde</b>	548 (23)	1249 (30)***	1797 (27)	23 (20)	54 (28)	77 (25)
<b>diabète</b>	571 (24)	1565 (37)***	2136 (32)	21 (18)	66 (34)**	87 (28)
<b>IC</b>	235 (10)	738 (17)***	973 (15)	6 (5)	26 (14)*	32 (10)
<b>hypertension</b>		4002 (95)	4002 (61)		183 (95)	183 (60)
<b>médication - IECA/ARA</b>	1987 (82)	3747 (89)***	5734 (87)	79 (69)	165 (86)***	244 (80)
<b>- béta bloquants</b>	1790 (75)	3156 (75)	4946 (75)	79 (69)	149 (86)	228 (80)
<b>- diurétique</b>	1284 (54)	2692 (64)***	3976 (60)	45 (39)	105 (55)*	150 (49)
<b>- aspirine</b>	2094 (88)	3758 (89)	5852 (88)	101 (89)	177 (92)	278 (91)
<b>- statines</b>	1213 (51)	1871 (44)***	3084 (47)	43 (38)	60 (31)	103 (34)
<b>- ACC</b>	258 (11)	806 (19)***	1064 (16)	27 (24)	58 (30)	85 (28)
<b>- anti-arythmiques</b>	262 (11)	519 (12)	781 (12)	20 (18)	32 (17)	52 (17)
<b>- digoxine</b>	321 (13)	680 (16)**	1001 (15)	14 (12)	16 (8)	30 (10)
<b>- nitrates</b>	1298 (55)	2811 (66)***	4109 (62)	80 (70)	155 (81)*	235 (77)
<b>- anticoagulants</b>	338 (14)	768 (18)***	1106 (17)	10 (9)	33 (17)*	43 (14)
<b>- supplémentation en potassium</b>	353 (15)	730 (17)*	1083 (16)	7 (6)	15 (8)	22 (7)

**Tableau 20 :** Paramètres des patients de l'étude EPHESUS. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD ou fréquence (en pourcentage). \* P < 0,05 \*\* P < 0,01 \*\*\* P < 0,001 vs contrôle. IMC : indice de masse corporelle ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche ; VOP : vitesse d'onde de pouls ; IC : insuffisance cardiaque ; eGFR : ratio estimé de la filtration glomérulaire ; IECA : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ; ARA : antagoniste du récepteur à l'angiotensine ; ACC : antagonistes des canaux calciques.

### VII.5.2. L'association entre la PP et les évènements cardiovasculaires

La mortalité avec ou sans hospitalisation et la mortalité cardiovasculaire dans le groupe total et dans le sous-groupe avec mesure de la VOP sont présentés en fonction de différents paramètres **tableau 21**. En ce qui concerne la cohorte dans son ensemble, l'administration d'éplérénone diminue le risque de mortalité totale et cardiovasculaire. Les augmentations de la PP et de la FEVG sont également corrélées à une diminution des événements. En revanche, une augmentation de l'âge une diminution de la PAM ou de l'eGFR sont liées à une augmentation de la mortalité. Au niveau du groupe d'étude de la VOP, une augmentation de la VOP est corrélée avec une augmentation de la mortalité.

	Mortalité ou hospitalisations pour causes cardiovasculaires		
	Mortalité totale	Mortalité cardiovasculaires	Mortalité cardiovasculaires
<b>Population totale</b>			
(évènements/patients)	(1017/6551)	(1824/6454)	(876/6551)
Eplérénone	0,86 (0,76-0,98)*	0,87 (0,80-0,96)**	0,84 (0,74-0,96)**
Age par incrément de 5 ans	1,20 (1,16-1,24)***	1,15 (1,12-1,17)***	1,12 (1,16-1,24)***
PP par incrément de 5 mmHg	0,96 (0,93-0,98)**	0,97 (0,95-0,99)***	0,95 (0,92-0,97)***
PAM < 90 mmHg	1,14 (1,00-1,30)*	NS	NS
Hématocrite par incrément de 5 %	NS	0,93 (0,89-0,98)**	NS
FEVG par incrément de 2 %	0,92 (0,90-0,93)***	0,92 (0,91-0,94)***	0,91 (0,89-0,93)***
eGFR < 60 ml/min/1,73 m <sup>2</sup>	1,54 (1,35-1,76)***	1,43 (1,29-1,58)***	1,51 (1,31-1,74)***
<b>Sous-catégorie étude VOP</b>			
(évènements/patients)	(28/306)	(64/306)	(26/306)
Age par incrément de 5 ans	NS	1,16 (1,03-1,30)*	NS
VOP par incrément de m/s	1,16 (1,03-1,30)*	NS	1,16 (1,03-1,31)*
FEVG par incrément de 2 %	0,84 (0,75-0,95)**	0,87 (0,81-0,94)***	0,84 (0,74-0,95)**

**Tableau 21 :** Association entre la PP et le risque d'évènements cardiovasculaires. Les résultats sont exprimés en (évènements/patients) et « hasard ratio » (95 % d'intervalle de confiance). \* P < 0,05 \*\* P < 0,01 \*\*\* P < 0,001 vs contrôle. IMC : indice de masse corporelle. PP : pression pulsée ; PAM : pression artérielle moyenne ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche ; eGFR : ratio estimé de la filtration glomérulaire ; VOP : vitesse d'onde de pouls.

### VII.5.3. Déterminant de la PP et de la VOP

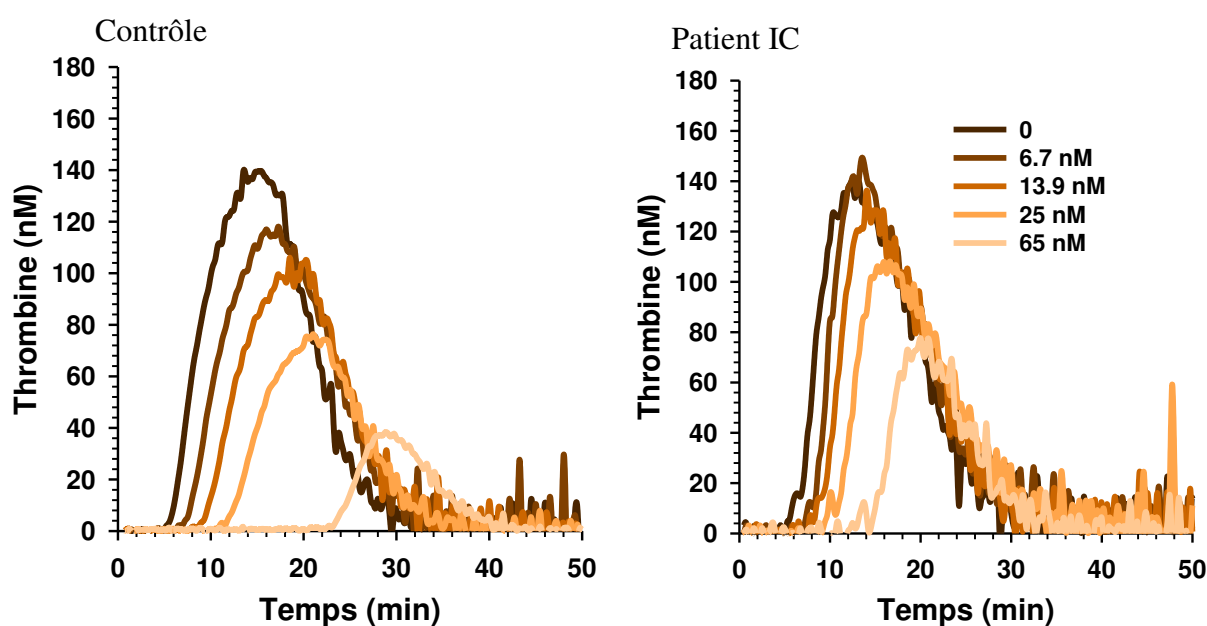
Le **tableau 22** présente le pourcentage d'association des paramètres de bases aux variations de la PP et de la VOP en corrélation multiple. La PAS explique plus de la moitié des variations de la PP. Le vieillissement explique quant à lui, la plus grande part des variations de la VOP, suivit ensuite par la PAS.

	PP (mmHg)		VOP (m/s)	
	Coefficient de régression $\pm$ SE	Variance %	Coefficient de régression $\pm$ SE	Variance %
<b>Population entière</b>				
PAS (par incrément de 5 mmHg)	2,92 $\pm$ 0,03***	53,8		
Age par incrément de 5 ans	0,64 $\pm$ 0,05***	1,2		
Hématocrite par incrément de 5 %	-1,05 $\pm$ 0,10***	0,7		
Fréquence cardiaque par incrément de 5 %	-0,29 $\pm$ 0,04***	0,3		
FEVG par incrément de 2 %	-0,5 $\pm$ 0,08***	0,2		
Variance totale %		61,0		
<b>Sous-catégorie étude VOP</b>				
<b>Modèle avec PAS</b>				
PAS (par incrément de 5 mmHg)	2,96 $\pm$ 0,13***	55,3	0,16 $\pm$ 0,05***	2,4
Age par incrément de 5 ans	0,80 $\pm$ 0,19***	1,9	0,54 $\pm$ 0,08***	13,0
Variance total %		68,2		20,1
<b>Modèle avec PP</b>				
PP (par incrément de 5 mmHg)			0,23 $\pm$ 0,07***	2,6
Age par incrément de 5 ans			0,52 $\pm$ 0,08***	11,2
Variance totale %				20,2

**Tableau 22 :** Paramètres expliquant les variations de pression pulsée et de la vitesse d'onde de pouls. SE : Erreur standard de l'estimation. \* P < 0,05 \*\* P < 0,01 \*\*\* P < 0,001. PAS : pression artérielle systolique ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche ; PP : pression pulsée.

#### VII.5.4. Résultats préliminaire de coagulation

Dans une première analyse de 5 patients atteints d'IC, avec des caractéristiques cliniques semblables aux patients de l'étude EPHESUS, il existe une tendance à une diminution de sensibilité au système anticoagulant de la PC. La **figure 61** présente des courbes typiques de génération de thrombine en présence de différentes concentrations en PCa comparées à un sujet sain.



**Figure 61 :** Courbe typique de génération de thrombine en présence de PCa avec les plasmas d'un patient atteint d'IC et d'un témoin. IC : insuffisance cardiaque.

## VIII. DISCUSSION

Des altérations de l'hémostase sont présentes dans des pathologies cardiovasculaires très communes telles que l'hypertension, l'IC ou encore des désordres métaboliques, notamment le SMet. Pourtant, alors qu'un risque augmenté de thrombose a été démontré chez l'homme, la mise en place d'un traitement préventif pour limiter ce risque d'évènements thrombotiques n'est pas systématique. Les traitements anti-thrombotiques, notamment les traitements combinant aspirine et inhibiteur du récepteur P2Y12, ne sont administrés qu'en prévention secondaire après un évènement thrombotique ou une chirurgie faisant intervenir un risque très augmenté comme la pose de stents<sup>307</sup>.

Nous avons voulu étudier de quelles manières l'hémostase peut être modifiée dans différents contextes pathologiques impliqués dans le développement de l'IC, et si ces modifications varient en fonction de son étiologie ou si elles ont un dénominateur commun.

L'étude de l'hémostase chez l'homme est souvent limitée à quelques paramètres. Les modèles animaux tels que le rat ou la souris permettent d'étudier la transition d'états pathologiques différents vers l'IC. De plus, il est possible d'évaluer le rôle de la paroi vasculaire. Le concept a émergé avec la prise de conscience que les facteurs et les cellules circulantes du sang ne représentent qu'une partie de l'équation hémostatique et que la paroi vasculaire est tout aussi importante. En effet, les cellules vasculaires synthétisent la plupart des facteurs de la coagulation et possèdent des récepteurs régulant la génération de thrombine.

Nous avons choisi d'étudier dans un premier temps un modèle murin de SMet, syndrome dont l'implication dans le développement et l'aggravation de l'IC a été décrite chez l'homme<sup>308</sup>. Très peu d'études ont été réalisées sur l'hémostase du rat Zucker et aucune sur les modifications intervenant avec le vieillissement. Ce modèle animal de SMet présente l'avantage de pouvoir étudier conjointement le phénotype artériel et de l'hémostase. Le vieillissement est généralement associé à des altérations de l'hémostase qui pourraient être exacerbées dans des contextes pathologiques comme celui du SMet. Il nous est donc apparu intéressant d'étudier les implications du vieillissement dans les altérations de l'hémostase en liaison avec les altérations de la paroi.

Notre laboratoire a déjà montré chez le rat Zucker un vieillissement artériel accéléré avec la présence d'un SMet. Les rats obèses à 25 semaines ne présentent pas d'altération des propriétés mécaniques des artères carotides par rapport aux rats non obèses, tandis qu'à 80 semaines l'élasticité est à la fois diminuée par rapport aux rats de 25 semaines, mais également par rapport aux rats non obèses au même âge<sup>275</sup>.

En ce qui concerne la réactivité plaquettaire, Paul et coll ont montré que les rats Zucker diabétiques de 12 semaines présentaient une augmentation de l'agrégation plaquettaire in vivo sans variation in vitro et ont conclu que cela était dû à une augmentation de l'agrégabilité plaquettaire couplée à la présence d'une dysfonction endothéliale (mise en évidence par une augmentation des taux plasmatiques de vWF)<sup>309</sup>. Dans notre étude nous avons également trouvé une numération plaquettaire augmentée chez les rats obèses sans modification de la réactivité évaluée par agrégation plaquettaire in vitro. L'augmentation des agrégats plaquettaires trouvés in vivo chez les rats Zucker par Paul et coll pourrait dépendre d'un endothélium altéré et d'un nombre de plaquettes plus élevé.

L'augmentation de la réactivité plaquettaire étant un versant majeur de la dérégulation de l'hémostase chez les patients diabétiques ou pré-diabétiques, plusieurs études ont essayé de diminuer la réactivité plaquettaire chez les rats Zucker diabétiques. L'administration d'acarbose (médicament utilisé dans le diabète de type 2 pour inhiber l'absorption intestinale de glucose) à des rats Zucker de 10 semaines diminue l'activation plaquettaire mesurée par la fixation des plaquettes au fibrinogène et les expressions à leur surface de P sélécine et de GP 53. Il est également à noter que dans cette étude l'activation plaquettaire des rats obèses non traités est augmentée d'environ 20 % par rapport aux rats non obèses non traités<sup>310</sup>. La même équipe a montré que l'administration de rimonabant, un médicament anti-obésité, antagoniste du récepteur canabinoïde 1, diminuait également la réactivité plaquettaire mais aussi les cytokines pro-inflammatoires et pro-athérogènes ainsi que les cellules circulantes du système immunitaire<sup>311</sup>. Cette étude montre ainsi que la diminution de l'inflammation a des répercussions directes sur l'agrégation plaquettaire. L'array de cytokines réalisé dans notre étude montre une augmentation de cytokines pro-inflammatoires. Il est toutefois difficile de penser qu'agir sur une cytokine en particulier pourrait être réellement bénéfique. Une action en amont directement sur l'inflammation globale semble être une stratégie plus intéressante.

Dans notre étude, le principal point qui diffère de ce qui est retrouvé chez l'homme est l'absence de modification de la réactivité plaquettaire. En effet, nous n'avons pas mis en évidence de modification de la réactivité en agrégation plaquettaire. De plus, la quantité de thrombine générée augmente de la même manière chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses en PDP et en PRP. Ce résultat indique donc que dans notre modèle la réactivité plaquettaire n'est pas un déterminant majeur de la génération de thrombine. Chez l'homme la réactivité plaquettaire est décrite comme étant augmentée<sup>197</sup>. Les variations de numération plaquettaire en cas de SMet sont encore sujettes à discussion mais iraient tout de même dans le sens d'une augmentation chez les patients atteints d'un SMet<sup>312,313</sup>. Une absence d'augmentation de la capacité d'activation des plaquettes serait compatible avec l'absence d'un risque thrombotique plus élevé chez le rat Zucker malgré une numération plaquettaire élevée.

En ce qui concerne les autres phases de l'hémostase, si une diminution de la fibrinolyse est bien caractérisée dans le SMet, l'augmentation de la réactivité du système de la coagulation l'est beaucoup moins. Nous avons montré chez le rat Zucker une augmentation de la réactivité de ce système sans modification avec l'âge par mesure de la génération de thrombine in vitro. Cette augmentation de la réactivité du système de la coagulation peut être en partie expliquée par l'augmentation des facteurs procoagulants tels que le FT, le FVIII, la prothrombine ou encore le fibrinogène. Ces facteurs procoagulants se maintiennent à un même niveau élevé chez les rats obèse âgés, ce qui pourrait expliquer le fait qu'il n'y ait pas de modification de la réactivité du système de la coagulation avec le vieillissement.

Au niveau plasmatique nous avons trouvé une concentration de FT d'environ 10 pM chez les rats obèses. Cette concentration est très élevée par rapport à celle de 5 pM que nous avons utilisée pour déclencher la cascade de coagulation dans le test de génération de thrombine in vitro. La nécessité d'ajouter du FT dans le plasma pour déclencher la coagulation, même chez les rats obèses, montre qu'une fraction plus ou moins importante de FT circulant n'est probablement pas fonctionnel. Les autres facteurs procoagulants que nous avons dosés, comme le FVIII et la prothrombine, sont également augmentés chez les rats obèses par rapport aux rats non obèses, ce qui rend pertinent notre modèle animal par rapport à la pathologie humaine. En effet, chez l'homme atteint de SMet des modifications semblables des concentrations circulantes en FT, FVIII sont présentes<sup>314-316</sup>.



En ce qui concerne la fibrinolyse, chez le rat Zucker une étude avait porté sur le traitement des rats avec du cipofibrate, qui possède un effet hypolipémiant, et avait montré une diminution des concentrations en fibrinogène plasmatique et plaquettaire<sup>317</sup>. De la même manière que lors de l'administration de rimonabant qui diminue la réactivité plaquettaire, l'action sur l'un des aspects du SMet modifie l'hémostase. Dans notre étude une augmentation des concentrations en fibrinogène plasmatique et une diminution de la fibrinolyse ont été observées avec une augmentation de ces modifications au cours du vieillissement. L'étude microscopique des caillots de fibrine a également montré la présence de fibres plus fines, indiquant un caillot formé plus rapidement, et de pores moins nombreux, indiquant un caillot plus difficile à lyser, chez les rats obèses à 25 semaines par rapport aux rats non obèses. Ces données expliquent la résistance à la fibrinolyse.

L'absence d'augmentation de la réactivité du système de la coagulation chez les rats obèses âgés en parallèle avec une diminution de la fibrinolyse suggère un rôle prépondérant de cette dernière sur l'augmentation du risque thrombotique avec le vieillissement. Un autre aspect important dans l'augmentation du risque de thrombose est l'altération de la fonction endothéliale, comme le montre l'augmentation des concentrations circulantes de vWF chez les rats obèses. Cette augmentation s'accroît avec le vieillissement chez les rats obèses. Cette altération endothéliale pourrait également expliquer l'augmentation des concentrations circulantes de FT. En effet, le FT n'est pas synthétisé de façon constitutive par les CE mais par les autres cellules de la paroi vasculaire. Une augmentation des concentrations circulantes pourrait ainsi avoir pour origine une altération de l'endothélium.

L'altération de l'hémostase qui précède les modifications fonctionnelles de la paroi pourrait favoriser le développement de l'IC. Le développement du tissu adipeux est en effet lié au risque de développement d'une IC<sup>318</sup>, en revanche rien n'est décrit concernant l'impact des facteurs de la coagulation. Le fibrinogène dont la synthèse est augmentée par les cytokines pro-inflammatoires, et qui a lui-même des effets pro-inflammatoires, pourrait altérer le phénotype vasculaire, ou encore participer à la génération de thrombine intra-pariétale. Cette génération de thrombine dans la paroi vasculaire pourrait favoriser la survenue de thrombose en cas de brèche vasculaire et notamment en cas de rupture de plaque d'athérome.

Nous avons choisi dans un second temps d'utiliser le rat SHR pour étudier l'une des composantes du SMet, l'hypertension, dont il est connu qu'elle est un élément moteur de la

mise en place de l'IC. Les rats SHR présentent une diminution de la réactivité du système de la coagulation au niveau plasmatique par rapport aux rats contrôles. Le dosage des facteurs de la coagulation plasmatique montre une diminution des concentrations de FT et de prothrombine, et une augmentation des concentrations de TFPI qui peuvent expliquer la diminution de la génération de thrombine observée chez les rats SHR. Le rôle de la prothrombine dans la diminution de l'ETP semble être central. En réalisant une mesure de génération de thrombine en PDP dilué le pouvoir anticoagulant de l'AT est également diminué. Dans ces conditions la différence entre SHR et Wistar au niveau de la génération de thrombine est atténuée mettant en lumière le rôle prédominant de la prothrombine dans la diminution d'ETP observée avec le plasma des rats SHR. Le fait que les changements de génération de thrombine entre SHR et Wistar soient les mêmes en prenant du PRP ou du PDP suggère qu'il n'y a pas de modification de la réactivité plaquettaire.

Bien que la part majeure des facteurs de la coagulation plasmatique dans le risque thrombotique ne soit plus à démontrer, certains éléments laissent penser qu'ils ne sont pas seuls responsables des altérations de la balance hémostatique. En effet, le risque de thrombose augmente très fortement avec le vieillissement, pourtant l'étude de la réactivité du système de la coagulation ne montre pas de différence, et ce, même si certains facteurs procoagulants peuvent être augmentés lorsqu'ils sont dosés individuellement. L'absence de modifications de la réactivité du système de la coagulation avec le vieillissement a été montrée dans notre laboratoire dans une cohorte de patients sains âgés. Ce résultat laisse penser que d'autres facteurs interviennent. Selon la triade de Virchow, deux autres composants jouent un rôle dans l'hémostase, une stase sanguine augmentée, et une altération des propriétés anticoagulantes de la paroi vasculaire. Les altérations, notamment de l'endothélium et de la réactivité vasculaire dans l'hypertension sont très bien décrites dans la littérature y compris dans des modèles animaux<sup>319-321</sup>. Nous avons trouvé une augmentation de la génération de thrombine à la surface d'anneaux aortiques de rats SHR comparés aux anneaux des rats Wistar de 12 semaines. Ce résultat met en évidence un phénotype prothrombotique de la paroi vasculaire. Il est également à noter qu'aucune différence entre SHR et Wistar n'est trouvée chez les rats de 5 semaines, indiquant que ce phénotype est probablement en rapport avec une hypertension bien établie. Une augmentation des concentrations circulantes en vWF chez les rats SHR de 12 semaines est en faveur d'une altération de l'endothélium. Cette altération pourrait contribuer à l'état hypercoagulable en permettant la mise en contact des facteurs

circulants de la coagulation avec les CML<sup>322</sup>. Le concept d'un phénotype altéré de l'hémostase, en partie dû aux CML de la paroi vasculaire, est étayé par une génération de thrombine augmentée à la surface des CML de rats SHR par rapport à celles des rats Wistar. De plus, il est également à noter que la génération de thrombine à la surface des CE n'est pas différente entre les deux souches. Les variations du phénotype de génération de thrombine de la paroi artérielle seraient donc principalement imputables aux CML. Lorsque les anneaux sont mis en présence du plasma du même rat la différence observée au niveau de la génération de thrombine des anneaux est compensée par l'hypocoagulabilité du plasma des rats SHR. Ces résultats sont compatibles avec l'absence d'événements thrombotiques chez le rat SHR. En revanche cette augmentation de la génération de thrombine intrapariétale pourrait participer à moduler un certain nombre de processus impliqués dans l'hypertension telles que la régulation du tonus vasculaire et la prolifération des CML qui participent à augmenter la rigidité artérielle<sup>40,322</sup>. Un rôle principal des cellules dans la coagulation est d'apporter des phospholipides chargés négativement. La mesure des PPA au niveau des anneaux aortiques montre une augmentation chez les rats SHR qui pourrait expliquer l'augmentation de génération de thrombine à la surface des CML des rats SHR. L'un des mécanismes est que l'hypertension augmente les taux de calcium intracellulaire, favorisant ainsi les processus de flip-flop et de réorganisation des membranes cellulaires des rats SHR<sup>323,324</sup>. L'implication de la paroi vasculaire dans le dérèglement de la balance hémostatique a probablement un rôle majeur qui jusque-là a été sous-estimé. La nécessité d'étudier directement la paroi vasculaire pour comprendre les molécules et les étapes impliquées dans la dérégulation de l'hémostase, et mettre au point des stratégies de traitements adaptées, fait prendre tout son sens à la nécessité de disposer de modèles animaux facilement utilisables et pertinents par rapport à la physiopathologie humaine.

Le système RAA participe à la régulation de la volémie. Un fonctionnement trop important de ce système va engendrer une augmentation de la volémie qui aura un rôle majeur dans le développement de l'hypertension. Chez les rats SHR pré-hypertendus, l'inhibition de ce système permet d'améliorer l'état artériel<sup>325</sup>. Chez les patients atteints d'IC l'administration d'un antagoniste du RM augmente la survie<sup>136</sup>. Enfin il a été établi que le récepteur à l'aldostérone avait un rôle important dans le développement du tissu adipeux et la différenciation adipocytaire, étape importante dans la mise en place du syndrome métabolique<sup>326</sup>. En ce qui concerne l'hémostase, le système RAA, et notamment

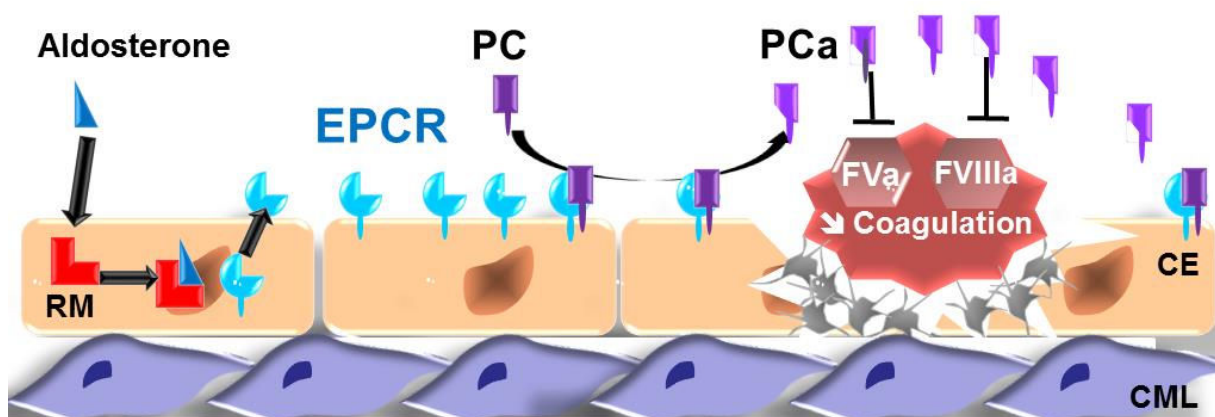
l'aldostérone, n'a pas été beaucoup étudié. L'aldostérone pourrait par son action profibrotique avoir un effet procoagulant<sup>165</sup>. Cette hormone peut également induire la synthèse d'EPCR, ce qui lui confère un rôle anticoagulant<sup>170</sup>.

Pour apporter des éléments de réponse, nous avons traité des souris avec de l'aldostérone et avons également étudié un modèle de souris qui surexpriment de manière conditionnelle le RM dans l'endothélium. Concernant les souris traitées à l'aldostérone une diminution du temps d'occlusion dans un modèle de thrombose carotidienne a été observée par rapport aux souris contrôles, suggérant un effet anticoagulant de l'aldostérone. L'utilisation d'un modèle de souris qui surexpriment dans l'endothélium le RM permet de s'assurer que l'effet observé de l'aldostérone est bien dépendant de son récepteur et non du RG. Ces souris transgéniques, ont une pression artérielle supérieure à celle de leurs contrôles<sup>160</sup>, et possèdent un endothélium activé comme en témoigne l'augmentation du vWF circulant. Cette activation pourrait être une conséquence de l'augmentation de PA et des contraintes mécaniques qui en résultent. Ces souris présentent une augmentation du temps d'occlusion d'un vaisseau dans un modèle de thrombose, ainsi qu'une diminution de l'agrégation sans modification des sécrétions plaquettaire. Pourtant, dans ces deux modèles, aucune modification de la capacité du plasma à générer de la thrombine n'est présente. Ce résultat laisse donc penser que le phénotype anti-thrombotique observé n'est pas la résultante de modifications des facteurs de la coagulation plasmatique mais plutôt d'une modification de la paroi vasculaire. Pour explorer les mécanismes impliqués dans cet effet de l'aldostérone nous avons quantifié les molécules anticoagulantes au niveau plasmatique et surtout au niveau pariétal. L'absence de modification au niveau des synthèses de TFPI et de TM exclut leur participation au phénotype observé dans le modèle de thrombose. L'EPCR est, quant à lui, augmenté dans la paroi vasculaire des souris mutées sans modification au niveau plasmatique. Ce dernier résultat peut être en partie expliqué par l'absence de modification entre les souris mutées et leurs contrôles, des concentrations d'ADAM 17, une métallopeptidase impliquée dans la protéolyse de l'EPCR<sup>83</sup>. De la même manière que dans la paroi vasculaire des souris, une augmentation de l'EPCR, dépendante du RM, est trouvée au niveau de CE traitées à l'aldostérone. Ces cellules ne présentent pas non plus de modification des autres molécules impliquées dans l'inhibition de la coagulation. De plus, les cellules traitées à l'aldostérone présentent une diminution de leurs capacités à servir de support pour la coagulation ce qui est en accord avec le phénotype « anti-thrombotique » trouvé chez les souris traitées à l'aldostérone. L'inhibition du système

anticoagulant de la PC fait disparaître la diminution de génération de thrombine observée avec les CE traitées à l'aldostérone permettant de conclure que cette diminution est bien due à une augmentation de la synthèse de l'EPCR. Ces résultats sont en accord avec le rôle de l'EPCR dans la modulation de la coagulation qui est bien décrit dans la littérature :

- Le traitement de CE avec de l'aldostérone augmente le temps de coagulation et la synthèse d'EPCR<sup>170</sup>
- Les souris surexprimant l'EPCR au niveau de l'endothélium ont une augmentation de leur capacité à convertir de la PC en PCa et présentent une diminution de la formation de thrombine lorsqu'elles sont perfusées avec du FXa<sup>88</sup>
- L'occupation du site de liaison de l'EPCR à la PC par un anticorps augmente les thrombus dans un modèle de thrombose au FeCl<sub>3</sub> chez la souris C57black6<sup>327</sup>

Ainsi, la synthèse d'EPCR est augmentée de manière RM-dépendante, ce qui permet d'augmenter la conversion de PC en PCa. C'est cette activité plus importante du système anticoagulant de la PC qui est mise en jeu dans la diminution de la thrombose observée chez les souris traitées à l'aldostérone et les souris surexprimant le RM dans l'endothélium (**Figure 62**).



**Figure 62 :** Schéma de l'action de l'aldostérone dans la régulation de l'hémostase dans un contexte physiologique.

Ces résultats soulèvent le paradoxe de l'utilisation des antagonistes du RM dans l'IC. En effet les patients atteints d'IC et traités par de la spironolactone ou de l'éplérénone en plus des autres traitements, ont une plus grande espérance de vie<sup>136-138</sup>. Ici nous avons trouvé un effet clairement anticoagulant de l'aldostérone. Un élément de réponse réside dans le contexte

physiopathologique. En effet, l'inhibition du RM chez les patients en état d'IC se situe dans un contexte pathologique, avec tout ce que cela implique d'altérations vasculaires. Dans ce contexte l'inhibition du RM est bénéfique. Dans un contexte physiologique, l'aldostérone et son récepteur ont un rôle différent, anticoagulant. Dans notre étude nous avons utilisé des souris saines ce qui peut expliquer ce phénotype antithrombotique. De plus il a été récemment montré que les pilules contraceptives de dernière génération augmentent le risque de thrombose<sup>168</sup>. Ces pilules contiennent de la drospirenone, molécule qui a une forte affinité pour le RM et peut être présentée comme un antagoniste du RM<sup>328</sup>. Ces pilules sont données chez des sujets sains et l'inhibition du rôle anticoagulant du RM dans ce contexte non pathologique pourrait être un des mécanismes expliquant l'augmentation du risque de thrombose.

L'étape suivante de ce travail a été d'étudier les modifications de l'hémostase dans l'IC. L'hémostase est présentée comme faisant partie des perturbations centrales aggravant cette maladie<sup>329</sup>. La première étape a été de distinguer les paramètres de fonction cardiaque et de fonction artérielle en utilisant la PP et la VOP. La cohorte EPHEBUS de patients présentant une IC avec dysfonction du ventricule gauche suite à un infarctus du myocarde est traitée avec un antagoniste du récepteur à l'aldostérone. Chez ces patients une augmentation de la PP est corrélée avec une diminution de la mortalité, tandis qu'une augmentation de la VOP est liée à une augmentation du risque de mortalité. Dans ce contexte, la PP n'est pas un index de rigidité artérielle mais un index de fonction cardiaque conservée. Ce résultat conforte le rôle prépondérant des modifications de la paroi artérielle par rapport aux altérations de la fonction cardiaque dans l'IC. En ce qui concerne l'hémostase, le fait que le vaisseau soit altéré précocement laisse penser que des modifications de l'hémostase pourraient être aussi très précoces avec comme élément central les contraintes mécanique appliquées aux cellules. Ce sont ces contraintes qui vont augmenter la synthèse de facteurs procoagulants mais également modifier la répartition des phospholipides procoagulants menant à un phénotype prothrombotique de la paroi artérielle comme celui trouvé chez les rats SHR. L'hypothèse d'une altération précoce de l'hémostase dans l'IC est également étayée dans notre modèle de rat Zucker puisque, bien que la fonction cardiaque n'ait pas été étudiée chez ces rats, la masse du cœur est augmentée chez les rats obèses à 80 semaines ce qui pourrait contribuer au développement d'une IC avec l'âge. Cependant dès 25 semaines le système de la coagulation et la fibrinolyse sont altérés chez ces rats. Ainsi, pour ce modèle, les altérations de

l'hémostase ont lieu très en amont d'une altération de la fonction cardiaque et sont également antérieures aux modifications de la paroi artérielle<sup>275</sup>.

Nos résultats ont montré que la PP était un index de la fonction cardiaque contrairement à la VOP qui reste un index de rigidité artérielle. Ces deux facteurs sont déterminants dans les changements de la balance hémostatique. Ces modifications peuvent impliquer le système de la PC en diminuant sa capacité à être activée par une altération des propriétés anticoagulantes de la paroi vasculaire et notamment de la disponibilité de l'EPCR. En effet, l'EPCR lorsqu'il est fixé à la surface des CE permet l'activation de la PC en PCa. Cette activité est perdue s'il est relargué dans la circulation<sup>84</sup>. Ainsi dans un contexte pathologique avec altération de l'endothélium telle que l'IC, la quantité d'EPCR circulant pourrait être augmentée par rapport à sa forme membranaire. Cela aurait donc pour effet de diminuer la proportion de PC pouvant être activée. L'utilisation d'un antagoniste du RM limiterait la synthèse d'EPCR et donc son relargage dans la circulation permettant de potentialiser l'activation de la PC par l'EPCR membranaire.

Les propriétés anticoagulantes de la PCa pourraient également être altérées par l'activation des plaquettes. En effet, l'activation plaquettaire induit un état de résistance à la PCa. Cette altération pourrait provenir du fait que les plaquettes activées relarguent du PF4<sup>330</sup>. En effet, bien que le PF4 puisse lier la TM et permettre l'activation de la PC en PCa il diminue l'activité anticoagulante de la PCa. Dans la cohorte EPHEBUS près de 90 % des patients sont sous aspirine. L'aspirine a un effet antiagrégant plaquettaire par l'inhibition irréversible des COX. Ce traitement pourrait avoir des effets bénéfiques sur le système de la PC en limitant l'activation des plaquettes. Ainsi, bien que l'administration d'anti-plaquettaire dans le traitement de l'IC ne soit pas encore systématique la majorité des patients est déjà traitée. Il serait intéressant de comparer la sensibilité à la PCa des patients prenant un anti-plaquettaire à celle de ceux n'ayant pas ce type de traitement.

A l'inverse du traitement anti-plaquettaire, moins de 20 % des patients de la cohorte EPHEBUS reçoivent un traitement anticoagulant. L'intérêt d'un traitement anticoagulant dans l'IC est plus discuté de par le risque d'hémorragique qu'il engendre et seuls les patients ayant eu des antécédents de thrombose reçoivent un tel traitement.

A l'heure actuelle la médecine dite personnalisée semble être l'étape suivante dans le traitement des patients. La personnalisation et le suivi des traitements anticoagulant et

antiplaquettaire dans des pathologies telles que le SMet, l'HTA ou l'IC pourraient permettre de diminuer encore le risque thrombotique. Pour réussir cette médecine personnalisée, il apparaît nécessaire d'augmenter la sensibilité des tests et de développer des nouveaux marqueurs plus précis que ceux existant (les dosages des F1+2 et des D-dimères n'étant pas fiable chez les patients âgées). Une meilleure compréhension des modifications de l'hémostase dans ces pathologies devrait également permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.



## **IX. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Nous avons montré au cours de ce travail les modifications du phénotype de l'hémostase dans différents modèles animaux de pathologies impliquées dans la mise en place de l'IC. La dérégulation de l'hémostase intervient très précocement dans la vie des rats Zucker atteints de SMet et reste stable alors que le défaut de fibrinolyse s'accroît avec le vieillissement. Le SMet correspond à un ensemble d'anomalies dont chacune peut avoir un retentissement sur l'hémostase. Une des anomalies du SMet les plus impliquées dans le développement de l'IC est l'hypertension. L'étude d'un modèle animal hypertendu permet de discriminer les modifications dues à l'ensemble des anomalies du SMet et celles induites par l'hypertension. Le modèle du rat spontanément hypertendu SHR présente une hypocoagulabilité plasmatique et une hypercoagulabilité de la paroi due au CML. Ces résultats ne permettent pas d'impliquer uniquement l'hypertension artérielle dans l'hypercoagulabilité plasmatique trouvée chez le rat Zucker. L'augmentation de la PA peut résulter d'une trop forte activation du système RAA, système dont le dernier acteur, l'aldostérone est présumé avoir des effets sur l'hémostase. Le récepteur à l'aldostérone étant présent sur les CE et ces cellules étant un élément central de la régulation de la réactivité vasculaire et de l'hémostase, nous avons étudié l'effet de cette hormone en traitant des souris avec de l'aldostérone et phénotypant des souris surexprimant le RM dans les CE. Dans nos modèles de souris l'aldostérone présente un effet antithrombotique en conditions physiologiques. Enfin, l'utilisation d'une cohorte de patients insuffisants cardiaques a permis de déterminer que la PP n'était pas liée à la rigidité artérielle montrant ainsi que la PP est un index de la fonction cardiaque à l'inverse de la VOP qui reste un index de rigidité artérielle, ces deux facteurs étant deux déterminants majeurs des changements de la balance hémostatique.

L'une des poursuites directes de ce travail va être de phénotyper des patients atteints d'IC pour mettre en évidence les anomalies de l'hémostase en rapport avec les altérations hémodynamiques ou les altérations de la paroi vasculaire et permettre de mieux cartographier la cascade d'événements aboutissant à ces anomalies. Cela permettra de les comparer aux anomalies de l'hémostase des patients présentant un SMet ou encore atteints d'HTA. Dans la mesure où les altérations de l'hémostase semblent très précoces elles pourraient avoir un rôle très important dans la genèse de la maladie. L'état des artères semble être l'un des facteurs déterminants dans la dégradation globale de l'hémostase car elles possèdent tous les facteurs

nécessaire à la génération de thrombine. Pour étudier l'état des artères il est nécessaire de disposer de modèles animaux. Dans un premier temps il serait nécessaire de disposer d'un modèle animal d'IC. Le rat Zucker obèse âgé présente une augmentation du poids du cœur pouvant être liée à une altération de la fonction cardiaque. Il serait donc intéressant de phénotyper la fonction cardiaque de ces rats pour bien définir son état d'altération et savoir s'ils peuvent être considérée comme insuffisants cardiaques. La seconde solution consisterait à utiliser le rat SHHF, modèle validé de SMet qui développe une IC en vieillissant.

Une autre perspective pourrait également concerner l'implication des cytokines et des adipokines dans l'hémostase. En effet très peu d'études ont porté sur l'implication de ces facteurs cellulaires dont la synthèse varie énormément en fonction du contexte physiopathologique. Chez l'homme, la synthèse d'adiponectine, une adipokine bénéfique pour le système cardiovasculaire, est inversement proportionnelle à la masse adipeuse. En ce qui concerne l'hémostase l'adiponectine diminue l'agrégation plaquettaire et augmente la synthèse de TFPI tout en diminuant celle de TF au niveau de CE<sup>306,331,332</sup>. Chez le rat Zucker les concentrations en adiponectine, corrélées avec l'activité du TFPI, sont augmentées chez les rats obèses. Il pourrait donc y avoir chez ces rats un mécanisme de compensation expliquant qu'ils ne présentent pas une prédisposition connue à thromboser en dépit de l'hypercoagulabilité et du défaut de fibrinolyse que nous avons mis en évidence.

Dans les trois pathologies, nous avons décrit des troubles de l'hémostase qui peuvent affecter les différentes phases et en particulier la génération de thrombine et la fibrinolyse. Ces modifications augmentent le risque cardiovasculaire.

## X. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Vallès, J. A., Vallano, A., Torres, F., Arnau, J. M. & Laporte, J. R. Multicentre hospital drug utilization study on the prophylaxis of venous thromboembolism. The Venous Thromboembolism Study Group of the Spanish Society of Clinical Pharmacology. *Br J Clin Pharmacol* **37**, 255–259 (1994).
2. Boneu, B. & Cazenave, J. P. *Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose 2e ed.* (1997).
3. Safar, M. E. & Lacolley, P. Disturbance of macro- and microcirculation: relations with pulse pressure and cardiac organ damage. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1–7 (2007).
4. Galley, H. F. & Webster, N. R. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* **93**, 105–113 (2004).
5. Pries, A. R., Secomb, T. W. & Gaehtgens, P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch.* **440**, 653–666 (2000).
6. Michiels, C. Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* **196**, 430–443 (2003).
7. Brandes, R. P., Fleming, I. & Busse, R. Endothelial aging. *Cardiovasc. Res.* **66**, 286–294 (2005).
8. Lee, W. L. & Liles, W. C. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr. Opin. Hematol.* **18**, 191–196 (2011).
9. Flammer, A. J. *et al.* The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* **126**, 753–767 (2012).
10. Bardin, N. *et al.* Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. *Thromb. Haemost.* **90**, 915–920 (2003).
11. Bella, J., Kolatkar, P. R., Marlor, C. W., Greve, J. M. & Rossmann, M. G. The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 4140–4145 (1998).
12. Rothlein, R., Dustin, M. L., Marlin, S. D. & Springer, T. A. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* **137**, 1270–1274 (1986).
13. Cook-Mills, J. M. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Mol. Immunol.* **39**, 499–508 (2002).
14. Serban, M. *et al.* Significance of platelet-activating factor acetylhydrolase in patients with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *J. Cell. Mol. Med.* **6**, 643–647 (2002).
15. Tsirois, L. D. *et al.* Reduced PAF-acetylhydrolase activity associated with Lp(a) in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* **177**, 193–201 (2004).
16. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
17. Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–526 (1987).
18. Palmer, R. M., Rees, D. D., Ashton, D. S. & Moncada, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1251–1256 (1988).
19. Stuehr, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 217–230 (1999).
20. Sessa, W. C., Harrison, J. K., Luthin, D. R., Pollock, J. S. & Lynch, K. R. Genomic analysis and expression patterns reveal distinct genes for endothelial and brain nitric oxide synthase. *Hypertension* **21**, 934–938 (1993).
21. Förstermann, U. & Kleinert, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **352**, 351–364 (1995).
22. Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109–142 (1991).
23. Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A. & Napoli, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **34**, 879–886 (1999).

24. Miura, H. & Gutterman, D. D. 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**, 501–507 (1998).
25. Triggle, C. R. *et al.* The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **90**, 713–738 (2012).
26. Husain, M. & Moss, J. Endothelium-dependent vascular smooth muscle control. *J Clin Anesth* **1**, 135–145 (1988).
27. Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I. & Coughlin, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057–1068 (1991).
28. McNamara, C. A. *et al.* Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J. Clin. Invest.* **91**, 94–98 (1993).
29. Borissoff, J. I., Spronk, H. M. H., Heeneman, S. & Ten Cate, H. Is thrombin a key player in the ‘coagulation-atherogenesis’ maze? *Cardiovasc. Res.* **82**, 392–403 (2009).
30. Rao, G. N., Delafontaine, P. & Runge, M. S. 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**, 27871–27875 (1995).
31. Rao, G. N. & Runge, M. S. 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**, 20805–20810 (1996).
32. Kanda, Y., Mizuno, K., Kuroki, Y. & Watanabe, Y. Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway. *Br. J. Pharmacol.* **132**, 1657–1664 (2001).
33. Tokunou, T. *et al.* Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1759–1763 (2001).
34. Zucker, S. *et al.* Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 23730–23738 (1995).
35. Galis, Z. S., Kranzhöfer, R., Fenton, J. W., 2nd & Libby, P. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 483–489 (1997).
36. Cao, H., Dronadula, N. & Rao, G. N. Thrombin induces expression of FGF-2 via activation of PI3K-Akt-Fra-1 signaling axis leading to DNA synthesis and motility in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **290**, C172–182 (2006).
37. Wu, S.-Q. & Aird, W. C. Thrombin, TNF-alpha, and LPS exert overlapping but nonidentical effects on gene expression in endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H873–885 (2005).
38. Chung, S.-W., Park, J.-W., Lee, S.-A., Eo, S.-K. & Kim, K. Thrombin promotes proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 748–754 (2010).
39. Ivey, M. E. & Little, P. J. Thrombin regulates vascular smooth muscle cell proteoglycan synthesis via PAR-1 and multiple downstream signalling pathways. *Thromb. Res.* **123**, 288–297 (2008).
40. Martin, K. *et al.* Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin. *Circ. Res.* **105**, 214–218 (2009).
41. Michel, J.-B. *et al.* Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1259–1268 (2007).
42. Solum, N. O. Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2841–2846 (1999).
43. Broos, K., Feys, H. B., De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K. & Deckmyn, H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* **25**, 155–167 (2011).

44. Lenting, P. J., Casari, C., Christophe, O. D. & Denis, C. V. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 2428–2437 (2012).
45. Sporn, L. A., Marder, V. J. & Wagner, D. D. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell* **46**, 185–190 (1986).
46. Ruggeri, Z. M. & Ware, J. von Willebrand factor. *FASEB J.* **7**, 308–316 (1993).
47. Andrews, R. K., López, J. A. & Berndt, M. C. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 91–105 (1997).
48. Lenting, P. J., Pegon, J. N., Groot, E. & De Groot, P. G. Regulation of von Willebrand factor-platelet interactions. *Thromb. Haemost.* **104**, 449–455 (2010).
49. Andrews, R. K., Gardiner, E. E., Shen, Y., Whisstock, J. C. & Berndt, M. C. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 1170–1174 (2003).
50. Varga-Szabo, D., Braun, A. & Nieswandt, B. Calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 1057–1066 (2009).
51. Bergmeier, W. & Stefanini, L. Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* **7 Suppl 1**, 187–190 (2009).
52. Bergmeier, W. *et al.* Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III. *J. Clin. Invest.* **117**, 1699–1707 (2007).
53. Chrzanowska-Wodnicka, M., Smyth, S. S., Schoenwaelder, S. M., Fischer, T. H. & White, G. C., 2nd. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *J. Clin. Invest.* **115**, 680–687 (2005).
54. Han, J. *et al.* Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Curr. Biol.* **16**, 1796–1806 (2006).
55. Blockmans, D., Deckmyn, H. & Vermynen, J. Platelet activation. *Blood Rev.* **9**, 143–156 (1995).
56. Bacon-Baguley, T., Ogilvie, M. L., Gartner, T. K. & Walz, D. A. Thrombospondin binding to specific sequences within the A  $\alpha$ - and B  $\beta$ -chains of fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **265**, 2317–2323 (1990).
57. Bonnefoy, A., Hantgan, R., Legrand, C. & Frojmovic, M. M. A model of platelet aggregation involving multiple interactions of thrombospondin-1, fibrinogen, and GPIIb/IIIa receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 5605–5612 (2001).
58. Tuszynski, G. P. *et al.* The interaction of human platelet thrombospondin with fibrinogen. Thrombospondin purification and specificity of interaction. *J. Biol. Chem.* **260**, 12240–12245 (1985).
59. Shattil, S. J. Signaling through platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb. Haemost.* **82**, 318–325 (1999).
60. Nurden, P., Nurden, A. & Conley, P. B. Le récepteur plaquettaire de l'ADP nouvellement identifié : P2Y<sub>12</sub>. *Hématologie* **8**, 273–279 (2002).
61. Kuwahara, M. *et al.* Platelet shape changes and adhesion under high shear flow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 329–334 (2002).
62. Lanza, F., Gachet, C., Tovo, D. & Mangin, P. Signalisation via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire. *Hématologie* **14**, 273–284 (2008).
63. Viera, A. J., Mooberry, M. & Key, N. S. Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and outcomes. *J Am Soc Hypertens* **6**, 243–252 (2012).
64. Siljander, P. R. M. Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb. Res.* **127 Suppl 2**, S30–33 (2011).
65. Butenas, S. & Mann, K. G. Blood coagulation. *Biochemistry Mosc.* **67**, 3–12 (2002).
66. WRIGHT, I. S. Nomenclature of blood clotting factors; acceptance by the International Committee on nomenclature of four factors, their characteristics and international number. *Can Med Assoc J* **80**, 659–661 (1958).
67. Freedman, S. J. *et al.* Identification of the phospholipid binding site in the vitamin K-dependent blood coagulation protein factor IX. *J. Biol. Chem.* **271**, 16227–16236 (1996).

68. Degen, S. J. & Davie, E. W. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* **26**, 6165–6177 (1987).
69. Huang, M. *et al.* Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 751–756 (2003).
70. Stenflo, J. Contributions of Gla and EGF-like domains to the function of vitamin K-dependent coagulation factors. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **9**, 59–88 (1999).
71. Putnam, F. . *The Plasma Proteins*. (Academic Press (NY), 1975).
72. Beeler, D., Rosenberg, R. & Jordan, R. Fractionation of low molecular weight heparin species and their interaction with antithrombin. *J. Biol. Chem.* **254**, 2902–2913 (1979).
73. Bedsted, T. *et al.* Heparin and calcium ions dramatically enhance antithrombin reactivity with factor IXa by generating new interaction exosites. *Biochemistry* **42**, 8143–8152 (2003).
74. Weiler, H. & Isermann, B. H. Thrombomodulin. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 1515–1524 (2003).
75. Esmon, C. T. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J. Biol. Chem.* **264**, 4743–4746 (1989).
76. Gomez, K. & McVey, J. H. Tissue factor initiated blood coagulation. *Front. Biosci.* **11**, 1349–1359 (2006).
77. Bauer, K. A. & Rosenberg, R. D. Role of antithrombin III as a regulator of in vivo coagulation. *Semin. Hematol.* **28**, 10–18 (1991).
78. Nesheim, M. E. A simple rate law that describes the kinetics of the heparin-catalyzed reaction between antithrombin III and thrombin. *J. Biol. Chem.* **258**, 14708–14717 (1983).
79. Foster, D. C., Yoshitake, S. & Davie, E. W. The nucleotide sequence of the gene for human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 4673–4677 (1985).
80. Esmon, C. T. The protein C pathway. *Chest* **124**, 26S–32S (2003).
81. Dahlbäck, B. & Villoutreix, B. O. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 1525–1534 (2003).
82. Fukudome, K. & Esmon, C. T. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 26486–26491 (1994).
83. Qu, D., Wang, Y., Esmon, N. L. & Esmon, C. T. Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 395–402 (2007).
84. Liaw, P. C., Neuenschwander, P. F., Smirnov, M. D. & Esmon, C. T. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J. Biol. Chem.* **275**, 5447–5452 (2000).
85. Esmon, C. T. Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor. *Crit. Care Med.* **32**, S298–301 (2004).
86. Navarro, S. *et al.* Haplotypes of the EPCR gene, prothrombin levels, and the risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A mutation. *Haematologica* **93**, 885–891 (2008).
87. Taylor, F. B., Jr, Peer, G. T., Lockhart, M. S., Ferrell, G. & Esmon, C. T. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* **97**, 1685–1688 (2001).
88. Li, W. *et al.* Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1351–1359 (2005).
89. Saposnik, B. *et al.* A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood* **103**, 1311–1318 (2004).
90. Wen, D. Z. *et al.* Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* **26**, 4350–4357 (1987).
91. Parkinson, J. F. *et al.* Stable expression of a secretable deletion mutant of recombinant human thrombomodulin in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 12602–12610 (1990).

92. Ye, J., Liu, L. W., Esmon, C. T. & Johnson, A. E. 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**, 11023–11028 (1992).
93. Fuentes-Prior, P. *et al.* Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* **404**, 518–525 (2000).
94. Dahlbäck, B. & Villoutreix, B. O. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1311–1320 (2005).
95. Rezende, S. M., Simmonds, R. E. & Lane, D. A. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood* **103**, 1192–1201 (2004).
96. Peraramelli, S., Rosing, J. & Hackeng, T. M. TFPI-dependent activities of protein S. *Thromb. Res.* **129 Suppl 2**, S23–26 (2012).
97. De Boer, J. P. *et al.* Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model. *Infect. Immun.* **61**, 5035–5043 (1993).
98. Rau, J. C., Mitchell, J. W., Fortenberry, Y. M. & Church, F. C. Heparin cofactor II: discovery, properties, and role in controlling vascular homeostasis. *Semin. Thromb. Hemost.* **37**, 339–348 (2011).
99. Kalsheker, N., Morley, S. & Morgan, K. Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 93–98 (2002).
100. Griffin, J. H., Zlokovic, B. V. & Mosnier, L. O. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int. J. Hematol.* **95**, 333–345 (2012).
101. Martí-Carvajal, A. J., Solà, I., Gluud, C., Lathyris, D. & Cardona, A. F. Human recombinant protein C for severe sepsis and septic shock in adult and paediatric patients. *Cochrane Database Syst Rev* **12**, CD004388 (2012).
102. Monroe, D. M., Hoffman, M. & Roberts, H. R. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1381–1389 (2002).
103. Taubman, M. B. *et al.* 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**, 547–552 (1993).
104. Edwards, R. L., Rickles, F. R. & Bobrove, A. M. Mononuclear cell tissue factor: cell of origin and requirements for activation. *Blood* **54**, 359–370 (1979).
105. Morrissey, J. H., Macik, B. G., Neuenschwander, P. F. & Comp, P. C. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* **81**, 734–744 (1993).
106. Koike, H., Okuda, D. & Morita, T. Mutations in autolytic loop-2 and at Asp554 of human prothrombin that enhance protein C activation by meizothrombin. *J. Biol. Chem.* **278**, 15015–15022 (2003).
107. Chen, Z., Pelc, L. A. & Di Cera, E. Crystal structure of prethrombin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 19278–19283 (2010).
108. Sié, P. & Claeysens, S. Mécanismes d'action pro-hémostatique du facteur VIIa recombinant. *Hématologie* **9**, 203–212 (2003).
109. Bevers, E. M., Comfurius, P. & Zwaal, R. F. Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure. *Blood Rev.* **5**, 146–154 (1991).
110. Saenko, E. L., Shima, M. & Sarafanov, A. G. Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 185–192 (1999).
111. Bagoly, Z., Koncz, Z., Hársfalvi, J. & Muszbek, L. Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb. Res.* **129**, 382–387 (2012).

112. Baugh, R. J., Broze, G. J., Jr & Krishnaswamy, S. Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor. *J. Biol. Chem.* **273**, 4378–4386 (1998).
113. Adams, M. Tissue factor pathway inhibitor: new insights into an old inhibitor. *Semin. Thromb. Hemost.* **38**, 129–134 (2012).
114. SEEGERS, W. H., JOHNSON, J. F. & FELL, C. An antithrombin reaction to prothrombin activation. *Am. J. Physiol.* **176**, 97–103 (1954).
115. Esmon, C. T. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* **61**, 122–131 (2008).
116. Pike, R. N., Buckle, A. M., Le Bonniec, B. F. & Church, F. C. Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS J.* **272**, 4842–4851 (2005).
117. España, F., Vicente, V., Tabernero, D., Scharrer, I. & Griffin, J. H. Determination of plasma protein C inhibitor and of two activated protein C-inhibitor complexes in normals and in patients with intravascular coagulation and thrombotic disease. *Thromb. Res.* **59**, 593–608 (1990).
118. Prendes, M. J. *et al.* Synthesis and ultrastructural localization of protein C inhibitor in human platelets and megakaryocytes. *Blood* **94**, 1300–1312 (1999).
119. Huntington, J. A., Kjellberg, M. & Stenflo, J. Crystal structure of protein C inhibitor provides insights into hormone binding and heparin activation. *Structure* **11**, 205–215 (2003).
120. Laurell, M., Christensson, A., Abrahamsson, P. A., Stenflo, J. & Lilja, H. Protein C inhibitor in human body fluids. Seminal plasma is rich in inhibitor antigen deriving from cells throughout the male reproductive system. *J. Clin. Invest.* **89**, 1094–1101 (1992).
121. Nishioka, J., Ning, M., Hayashi, T. & Suzuki, K. Protein C inhibitor secreted from activated platelets efficiently inhibits activated protein C on phosphatidylethanolamine of platelet membrane and microvesicles. *J. Biol. Chem.* **273**, 11281–11287 (1998).
122. Cesarman-Maus, G. & Hajjar, K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* **129**, 307–321 (2005).
123. Fuhrman, B. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **222**, 8–14 (2012).
124. Cesari, M., Pahor, M. & Incalzi, R. A. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther* **28**, e72–91 (2010).
125. Lang, C. C. & Struthers, A. D. Targeting the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *Nat Rev Cardiol* **10**, 125–134 (2013).
126. GRUNDY, H. M., SIMPSON, S. A. & TAIT, J. F. Isolation of a highly active mineralocorticoid from beef adrenal extract. *Nature* **169**, 795–796 (1952).
127. Gründer, S. & Rossier, B. C. A reappraisal of aldosterone effects on the kidney: new insights provided by epithelial sodium channel cloning. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **6**, 35–39 (1997).
128. Baker, M. E., Chandsawangbhuwana, C. & Ollikainen, N. Structural analysis of the evolution of steroid specificity in the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *BMC Evol. Biol.* **7**, 24 (2007).
129. Sheppard, K. & Funder, J. W. Mineralocorticoid specificity of renal type I receptors: in vivo binding studies. *Am. J. Physiol.* **252**, E224–229 (1987).
130. Yang, J. & Young, M. J. The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *J. Mol. Endocrinol.* **43**, 53–64 (2009).
131. Berardelli, R. *et al.* Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans. *Endocrine* **43**, 51–58 (2013).
132. Hernández-Díaz, I. *et al.* The mineralocorticoid receptor is a constitutive nuclear factor in cardiomyocytes due to hyperactive nuclear localization signals. *Endocrinology* **151**, 3888–3899 (2010).
133. Colussi, G., Catena, C. & Sechi, L. A. Spironolactone, eplerenone and the new aldosterone blockers in endocrine and primary hypertension. *J. Hypertens.* **31**, 3–15 (2013).



134. Batterink, J., Stabler, S. N., Tejani, A. M. & Fowkes, C. T. Spironolactone for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* CD008169 (2010). doi:10.1002/14651858.CD008169.pub2
135. Craft, J. Eplerenone (Inspra), a new aldosterone antagonist for the treatment of systemic hypertension and heart failure. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **17**, 217–220 (2004).
136. Pitt, B. *et al.* The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* **341**, 709–717 (1999).
137. Pitt, B. *et al.* Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1309–1321 (2003).
138. Zannad, F. *et al.* Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N. Engl. J. Med.* **364**, 11–21 (2011).
139. Kim, P. J., Cole, M. A., Kalman, B. A. & Spencer, R. L. Evaluation of RU28318 and RU40555 as selective mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor antagonists, respectively: receptor measures and functional studies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **67**, 213–222 (1998).
140. Krozowski, Z. *et al.* The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **69**, 391–401 (1999).
141. Ferrari, P. & Krozowski, Z. Role of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in blood pressure regulation. *Kidney Int.* **57**, 1374–1381 (2000).
142. Agarwal, A. K., Monder, C., Eckstein, B. & White, P. C. Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11 beta-dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**, 18939–18943 (1989).
143. Ricketts, M. L. *et al.* Immunohistochemical localization of type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 1325–1335 (1998).
144. Condon, J., Ricketts, M. L., Whorwood, C. B. & Stewart, P. M. Ontogeny and sexual dimorphic expression of mouse type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol. Cell. Endocrinol.* **127**, 121–128 (1997).
145. Albiston, A. L., Obeyesekere, V. R., Smith, R. E. & Krozowski, Z. S. Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol. Cell. Endocrinol.* **105**, R11–17 (1994).
146. Moore, X. L., Hoong, I. & Cole, T. J. Expression of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene in the mouse. *Kidney Int.* **57**, 1307–1312 (2000).
147. Brilla, C. G., Pick, R., Tan, L. B., Janicki, J. S. & Weber, K. T. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ. Res.* **67**, 1355–1364 (1990).
148. Tsuchiya, K., Yoshimoto, T. & Hirata, Y. Endothelial dysfunction is related to aldosterone excess and raised blood pressure. *Endocr. J.* **56**, 553–559 (2009).
149. Griol-Charhbili, V. *et al.* Epidermal growth factor receptor mediates the vascular dysfunction but not the remodeling induced by aldosterone/salt. *Hypertension* **57**, 238–244 (2011).
150. Jeong, Y. *et al.* Aldosterone activates endothelial exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 3782–3787 (2009).
151. De Rita, O., Hackam, D. G. & Spence, J. D. Effects of aldosterone on human atherosclerosis: plasma aldosterone and progression of carotid plaque. *Can J Cardiol* **28**, 706–711 (2012).
152. Raz-Pasteur, A., Gamliel-Lazarovich, A., Gantman, A., Coleman, R. & Keidar, S. Mineralocorticoid receptor blockade inhibits accelerated atherosclerosis induced by a low sodium diet in apolipoprotein E-deficient mice. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* (2012). doi:10.1177/1470320312467558
153. Hashikabe, Y., Suzuki, K., Jojima, T., Uchida, K. & Hattori, Y. Aldosterone impairs vascular endothelial cell function. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **47**, 609–613 (2006).
154. Caprio, M. *et al.* Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. *Circ. Res.* **102**, 1359–1367 (2008).

155. Krug, A. W. *et al.* Aldosterone rapidly induces leukocyte adhesion to endothelial cells: a new link between aldosterone and arteriosclerosis? *Hypertension* **50**, e156–157 (2007).
156. Sekizawa, N. *et al.* Transcriptome analysis of aldosterone-regulated genes in human vascular endothelial cell lines stably expressing mineralocorticoid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **341**, 78–88 (2011).
157. Nishizaka, M. K., Zaman, M. A., Green, S. A., Renfro, K. Y. & Calhoun, D. A. Impaired endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in hypertensive subjects with hyperaldosteronism. *Circulation* **109**, 2857–2861 (2004).
158. Thum, T. *et al.* Impairment of endothelial progenitor cell function and vascularization capacity by aldosterone in mice and humans. *Eur. Heart J.* **32**, 1275–1286 (2011).
159. Christy, C. *et al.* 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in mouse aorta: localization and influence on response to glucocorticoids. *Hypertension* **42**, 580–587 (2003).
160. Nguyen Dinh Cat, A. *et al.* The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J.* **24**, 2454–2463 (2010).
161. Jaffe, I. Z. & Mendelsohn, M. E. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circ. Res.* **96**, 643–650 (2005).
162. Bafford, R. *et al.* Mineralocorticoid receptor expression in human venous smooth muscle cells: a potential role for aldosterone signaling in vein graft arterialization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, H41–47 (2011).
163. Hadoke, P. W. *et al.* Endothelial cell dysfunction in mice after transgenic knockout of type 2, but not type 1, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Circulation* **104**, 2832–2837 (2001).
164. Deuchar, G. A. *et al.* 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency accelerates atherogenesis and causes proinflammatory changes in the endothelium in apoe<sup>-/-</sup> mice. *Endocrinology* **152**, 236–246 (2011).
165. Stankiewicz, A. *et al.* Acute aldosterone infusion enhances thrombosis development in normotensive rats. *Thromb. Haemost.* **98**, 697–699 (2007).
166. Gromotowicz, A. *et al.* Study of the mechanisms of aldosterone prothrombotic effect in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **12**, 430–439 (2011).
167. Ma, J. *et al.* Differing effects of mineralocorticoid receptor-dependent and -independent potassium-sparing diuretics on fibrinolytic balance. *Hypertension* **46**, 313–320 (2005).
168. Wu, C. Q. *et al.* Drospirenone-containing oral contraceptive pills and the risk of venous and arterial thrombosis: a systematic review. *BJOG* **120**, 801–810 (2013).
169. Fuhrmann, U., Krattenmacher, R., Slater, E. P. & Fritzscheier, K. H. The novel progestin drospirenone and its natural counterpart progesterone: biochemical profile and antiandrogenic potential. *Contraception* **54**, 243–251 (1996).
170. Ducros, E. *et al.* Aldosterone modifies hemostasis via upregulation of the protein-C receptor in human vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 192–196 (2008).
171. Kylin, E. Studien über das Hypertonie-.Hyperglykemie-.hyperurikemie-syndrom. *Zentralblatt für. Innere Medizin* 1889–1975 (1923).
172. Haller, H. [Epidemiology and associated risk factors of hyperlipoproteinemia]. *Z Gesamte Inn Med* **32**, 124–128 (1977).
173. Alberti, K. G. & Zimmet, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* **15**, 539–553 (1998).
174. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). 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**, 3143–3421 (2002).

175. Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P., Shaw, J. & IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* **366**, 1059–1062 (2005).
176. Yamatani, H., Takahashi, K., Yoshida, T., Soga, T. & Kurachi, H. Differences in the fatty acid metabolism of visceral adipose tissue in postmenopausal women. *Menopause* (2013). doi:10.1097/GME.0b013e318296431a
177. Park, Y.-W. *et al.* The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch. Intern. Med.* **163**, 427–436 (2003).
178. Eckel, R. H., Grundy, S. M. & Zimmet, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet* **365**, 1415–1428 (2005).
179. Aguilar-Salinas, C. A. *et al.* High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. *Arch. Med. Res.* **35**, 76–81 (2004).
180. Grundy, S. M. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 629–636 (2008).
181. Monteiro, R. & Azevedo, I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* **2010**, (2010).
182. Alessi, M.-C. & Juhan-Vague, I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. *Thromb. Haemost.* **99**, 995–1000 (2008).
183. Gustafson, B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* **17**, 332–341 (2010).
184. Fontana, L., Eagon, J. C., Trujillo, M. E., Scherer, P. E. & Klein, S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* **56**, 1010–1013 (2007).
185. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
186. Isomaa, B. *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* **24**, 683–689 (2001).
187. Timar, O., Sestier, F. & Levy, E. Metabolic syndrome X: a review. *Can J Cardiol* **16**, 779–789 (2000).
188. Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L. & Ranganathan, G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, E745–751 (2001).
189. Martens, F. M. A. C., Van der Graaf, Y., Dijk, J. M., Olijhoek, J. K. & Visseren, F. L. J. Carotid arterial stiffness is marginally higher in the metabolic syndrome and markedly higher in type 2 diabetes mellitus in patients with manifestations of arterial disease. *Atherosclerosis* **197**, 646–653 (2008).
190. Eichinger, S. *et al.* Overweight, obesity, and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Arch. Intern. Med.* **168**, 1678–1683 (2008).
191. Carter, A. M., Cymbalista, C. M., Spector, T. D., Grant, P. J. & EuroCLOT Investigators. Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2783–2789 (2007).
192. Samad, F., Pandey, M. & Loskutoff, D. J. Regulation of tissue factor gene expression in obesity. *Blood* **98**, 3353–3358 (2001).
193. Sonnenberg, G. E., Krakower, G. R. & Kissebah, A. H. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obes. Res.* **12**, 180–186 (2004).
194. Lim, H. S., Lip, G. Y. H. & Blann, A. D. Plasma von Willebrand factor and the development of the metabolic syndrome in patients with hypertension. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 5377–5381 (2004).
195. Pandolfi, A. *et al.* Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1378–1382 (2001).

196. Poli, K. A. *et al.* Association of blood pressure with fibrinolytic potential in the Framingham offspring population. *Circulation* **101**, 264–269 (2000).
197. Santilli, F., Vazzana, N., Liani, R., Guagnano, M. T. & Davì, G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obesity Reviews* **13**, 27–42 (2012).
198. Morel, O. *et al.* Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 2594–2604 (2006).
199. Mesri, M. & Altieri, D. C. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 23111–23118 (1999).
200. Carretero, O. A. & Oparil, S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* **101**, 329–335 (2000).
201. Kearney, P. M. *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* **365**, 217–223 (2005).
202. Mounier-Vehier, C., Amah, G., Covillard, J., Jaboureck, O. & Phan, T. M. [Management of essential arterial hypertension and cardiovascular risk levels. Observation in general medicine: national PHENOMEN study. Evaluation and stratification of cardiovascular risk based on the 2000 ANAES recommendations in a population of hypertensive patients]. *Arch Mal Coeur Vaiss* **95**, 667–672 (2002).
203. Sodium, potassium, body mass, alcohol and blood pressure: the INTERSALT Study. The INTERSALT Co-operative Research Group. *J Hypertens Suppl* **6**, S584–586 (1988).
204. Sever, P. S. & Poulter, N. R. A hypothesis for the pathogenesis of essential hypertension: the initiating factors. *J Hypertens Suppl* **7**, S9–12 (1989).
205. Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L. & Taddei, S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 527–536 (2009).
206. Boutouyrie, P. *et al.* Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension* **39**, 10–15 (2002).
207. Borissoff, J. I., Spronk, H. M. H. & Ten Cate, H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1746–1760 (2011).
208. O'Rourke, M. F. & Hashimoto, J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 1–13 (2007).
209. Wolinsky, H. & Glagov, S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ. Res.* **20**, 99–111 (1967).
210. Laurent, S. *et al.* Local pulse pressure is a major determinant of large artery remodelling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **28**, 1011–1014 (2001).
211. O'Rourke, M. Arterial stiffness, systolic blood pressure, and logical treatment of arterial hypertension. *Hypertension* **15**, 339–347 (1990).
212. O'Rourke, M. F., Staessen, J. A., Vlachopoulos, C., Duprez, D. & Plante, G. E. Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values. *Am. J. Hypertens.* **15**, 426–444 (2002).
213. Franklin, S. S. Pulse pressure as a risk factor. *Clin. Exp. Hypertens.* **26**, 645–652 (2004).
214. Latham, R. D. *et al.* Regional wave travel and reflections along the human aorta: a study with six simultaneous micromanometric pressures. *Circulation* **72**, 1257–1269 (1985).
215. 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.* **11**, 147–159 (2005).
216. Junker, R., Heinrich, J., Schulte, H., Erren, M. & Assmann, G. Hemostasis in normotensive and hypertensive men: results of the PROCAM study. The prospective cardiovascular Münster study. *J. Hypertens.* **16**, 917–923 (1998).
217. Lip, G. Y. & Li-Saw-Hee, F. L. Does hypertension confer a hypercoagulable state? *J. Hypertens.* **16**, 913–916 (1998).

218. Regnault, V. *et al.* Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1226–1232 (2011).
219. Corseaux, D. *et al.* Hemostasis imbalance in experimental hypertension. *Mol. Med.* **8**, 169–178 (2002).
220. Sawada, K. *et al.* Hypertension associated with reduced plasma thrombomodulin levels and a hypercoagulable state in rats. *Clin. Exp. Hypertens.* **25**, 73–84 (2003).
221. Gomibuchi, H. *et al.* 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 (2007).
222. Naess, I. A. *et al.* Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 692–699 (2007).
223. Engbers, M. J., Van Hylckama Vlieg, A. & Rosendaal, F. R. Venous thrombosis in the elderly: incidence, risk factors and risk groups. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 2105–2112 (2010).
224. Cushman, M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin. Hematol.* **44**, 62–69 (2007).
225. GIBBS, N. M. Venous thrombosis of the lower limbs with particular reference to bed-rest. *Br J Surg* **45**, 209–236 (1957).
226. Cohen, S. H., Ehrlich, G. E., Kauffman, M. S. & Cope, C. Thrombophlebitis following knee surgery. *J Bone Joint Surg Am* **55**, 106–112 (1973).
227. Heit, J. A. *et al.* Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch. Intern. Med.* **160**, 809–815 (2000).
228. Smith, J. A., Jr. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *J. Urol.* **174**, 1300 (2005).
229. Aras, R., Sowers, J. R. & Arora, R. The proinflammatory and hypercoagulable state of diabetes mellitus. *Rev Cardiovasc Med* **6**, 84–97 (2005).
230. Koster, T. *et al.* Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. A case-control study of plasma levels and DNA polymorphisms—the Leiden Thrombophilia Study (LETS). *Thromb. Haemost.* **71**, 719–722 (1994).
231. Koster, T., Blann, A. D., Briët, E., Vandenbroucke, J. P. & Rosendaal, F. R. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* **345**, 152–155 (1995).
232. Meijers, J. C., Tekelenburg, W. L., Bouma, B. N., Bertina, R. M. & Rosendaal, F. R. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N. Engl. J. Med.* **342**, 696–701 (2000).
233. Mari, D., Coppola, R. & Provenzano, R. Hemostasis factors and aging. *Exp. Gerontol.* **43**, 66–73 (2008).
234. Stec, J. J. *et al.* Association of fibrinogen with cardiovascular risk factors and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Population. *Circulation* **102**, 1634–1638 (2000).
235. Tsai, A. W. *et al.* Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). *Am. J. Med.* **113**, 636–642 (2002).
236. Van Hylckama Vlieg, A. & Rosendaal, F. R. High levels of fibrinogen are associated with the risk of deep venous thrombosis mainly in the elderly. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 2677–2678 (2003).
237. Larsson, L., Grimby, G. & Karlsson, J. Muscle strength and speed of movement in relation to age and muscle morphology. *J Appl Physiol* **46**, 451–456 (1979).
238. Olsen, H. & Länne, T. Reduced venous compliance in lower limbs of aging humans and its importance for capacitance function. *Am. J. Physiol.* **275**, H878–886 (1998).

239. Carpentier, P. H., Maricq, H. R., Biro, C., Ponçot-Makinen, C. O. & Franco, A. Prevalence, risk factors, and clinical patterns of chronic venous disorders of lower limbs: a population-based study in France. *J. Vasc. Surg.* **40**, 650–659 (2004).
240. Carpentier, P. & Priollet, P. [Epidemiology of chronic venous insufficiency]. *Presse Med* **23**, 197–201 (1994).
241. Migliacci, R. *et al.* Endothelial dysfunction in patients with spontaneous venous thromboembolism. *Haematologica* **92**, 812–818 (2007).
242. Chopard, R. P., Miranda Neto, M. H., Biazotto, W. & Molinari, S. L. Age-related changes in the human renal veins and their valves. *Ital J Anat Embryol* **99**, 91–101 (1994).
243. Brooks, E. G. *et al.* Valves of the deep venous system: an overlooked risk factor. *Blood* **114**, 1276–1279 (2009).
244. Bergan, J. J. *et al.* Chronic venous disease. *N. Engl. J. Med.* **355**, 488–498 (2006).
245. Heit, J. A. *et al.* The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thromb. Haemost.* **86**, 452–463 (2001).
246. Folsom, A. R. *et al.* Frailty and risk of venous thromboembolism in older adults. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **62**, 79–82 (2007).
247. McMurray, J. J. V. & Pfeffer, M. A. Heart failure. *Lancet* **365**, 1877–1889 (2005).
248. De Keulenaer, G. W. & Brutsaert, D. L. Systolic and diastolic heart failure are overlapping phenotypes within the heart failure spectrum. *Circulation* **123**, 1996–2004; discussion 2005 (2011).
249. Rodgers, J. E. & Patterson, J. H. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the management of heart failure. *Pharmacotherapy* **20**, 368S–378S (2000).
250. Baudet, C., Drouillard, Philip, V. & Labrousse, L. Clinical evaluation of the CorCap<sup>®</sup> cardiac support device in patients with progressive heart failure. *Journal de Pharmacie Clinique* (2007).
251. Nixon, J. V. Left ventricular mural thrombus. *Arch. Intern. Med.* **143**, 1567–1571 (1983).
252. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N. Engl. J. Med.* **325**, 293–302 (1991).
253. Cohn, J. N. *et al.* Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N. Engl. J. Med.* **314**, 1547–1552 (1986).
254. Loh, E. *et al.* Ventricular dysfunction and the risk of stroke after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **336**, 251–257 (1997).
255. Lip, G. Y. & Gibbs, C. R. Does heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's triad revisited. *J. Am. Coll. Cardiol.* **33**, 1424–1426 (1999).
256. Kubo, S. H., Rector, T. S., Bank, A. J., Williams, R. E. & Heifetz, S. M. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* **84**, 1589–1596 (1991).
257. Marti, C. N. *et al.* Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1455–1469 (2012).
258. Sbarouni, E. *et al.* Relationship between hemostatic abnormalities and neuroendocrine activity in heart failure. *Am. Heart J.* **127**, 607–612 (1994).
259. Lip, G. Y., Lowe, G. D., Metcalfe, M. J., Rumley, A. & Dunn, F. G. Effects of warfarin therapy on plasma fibrinogen, von Willebrand factor, and fibrin D-dimer in left ventricular dysfunction secondary to coronary artery disease with and without aneurysms. *Am. J. Cardiol.* **76**, 453–458 (1995).
260. Jafri, S. M. *et al.* Platelet function, thrombin and fibrinolytic activity in patients with heart failure. *Eur. Heart J.* **14**, 205–212 (1993).
261. Jafri, S. M., Mammen, E. F., Masura, J. & Goldstein, S. Effects of warfarin on markers of hypercoagulability in patients with heart failure. *Am. Heart J.* **134**, 27–36 (1997).
262. Cleland, J. G. F. *et al.* The Warfarin/Aspirin Study in Heart failure (WASH): a randomized trial comparing antithrombotic strategies for patients with heart failure. *Am. Heart J.* **148**, 157–164 (2004).

263. Massie, B. M. *et al.* Randomized trial of warfarin, aspirin, and clopidogrel in patients with chronic heart failure: the Warfarin and Antiplatelet Therapy in Chronic Heart Failure (WATCH) trial. *Circulation* **119**, 1616–1624 (2009).
264. Cokkinos, D. V., Haralabopoulos, G. C., Kostis, J. B., Toutouzas, P. K. & HELAS investigators. Efficacy of antithrombotic therapy in chronic heart failure: the HELAS study. *Eur. J. Heart Fail.* **8**, 428–432 (2006).
265. Homma, S. *et al.* Warfarin and aspirin in patients with heart failure and sinus rhythm. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1859–1869 (2012).
266. Al-Khadra, A. S. *et al.* Antiplatelet agents and survival: a cohort analysis from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **31**, 419–425 (1998).
267. Dunkman, W. B. *et al.* Incidence of thromboembolic events in congestive heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* **87**, VI94–101 (1993).
268. Dangas, G. *et al.* Abstract 15919: Impact of Bivalirudin Therapy on Mortality in Patients With High Risk Features Undergoing PCI: A Patient-Level Pooled Analysis From the REPLACE-2, ACUITY and HORIZONS-AMI Trials. *Circulation* (2011).
269. Bonde, L. *et al.* Increased mortality associated with low use of clopidogrel in patients with heart failure and acute myocardial infarction not undergoing percutaneous coronary intervention: a nationwide study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 1300–1307 (2010).
270. Pinet, C. *et al.* Protease-activated receptor-1 mediates thrombin-induced persistent sodium current in human cardiomyocytes. *Mol. Pharmacol.* **73**, 1622–1631 (2008).
271. Alesci, S. *et al.* First report on the effect of thrombin and factor Xa on cardiomyocytes in a three-dimensional cell culture model. *Thromb. Res.* **124**, 375–376 (2009).
272. Mirabet, M., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Barrabés, J. A. & Soler-Soler, J. Thrombin increases cardiomyocyte acute cell death after ischemia and reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **39**, 277–283 (2005).
273. Jaffré, F., Friedman, A. E., Hu, Z., Mackman, N. & Blaxall, B. C.  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation transactivates protease-activated receptor 1 via matrix metalloproteinase 13 in cardiac cells. *Circulation* **125**, 2993–3003 (2012).
274. Shimizu, H., Oh-I, S., Okada, S. & Mori, M. Leptin resistance and obesity. *Endocr. J.* **54**, 17–26 (2007).
275. Sloboda, N. *et al.* Fatty acids impair endothelium-dependent vasorelaxation: a link between obesity and arterial stiffness in very old Zucker rats. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **67**, 927–938 (2012).
276. ZUCKER, T. F. & ZUCKER, L. M. Fat accretion and growth in the rat. *J. Nutr.* **80**, 6–19 (1963).
277. Takaya, K. *et al.* Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs-- identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 75–83 (1996).
278. Yamashita, T., Murakami, T., Iida, M., Kuwajima, M. & Shima, K. Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes* **46**, 1077–1080 (1997).
279. Friedman, J. M. & Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763–770 (1998).
280. Truett, G. E., Walker, J. A. & Harris, R. B. A developmental switch affecting growth of fatty rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**, R1956–1963 (2000).
281. Godbole, V. & York, D. A. Lipogenesis in situ in the genetically obese Zucker fatty rat (fa/fa): role of hyperphagia and hyperinsulinaemia. *Diabetologia* **14**, 191–197 (1978).
282. Argilés, J. M. The obese Zucker rat: a choice for fat metabolism 1968-1988: twenty years of research on the insights of the Zucker mutation. *Prog. Lipid Res.* **28**, 53–66 (1989).
283. Collins, S. *et al.* Role of leptin in fat regulation. *Nature* **380**, 677 (1996).
284. Saladin, R. *et al.* Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* **377**, 527–529 (1995).

285. Stephens, T. W. *et al.* The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* **377**, 530–532 (1995).
286. Ceddia, R. B., William, W. N., Jr, Carpinelli, A. R. & Curi, R. Modulation of insulin secretion by leptin. *Gen. Pharmacol.* **32**, 233–237 (1999).
287. Konstantinides, S., Schäfer, K., Koschnick, S. & Loskutoff, D. J. Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J. Clin. Invest.* **108**, 1533–1540 (2001).
288. Konstantinides, S., Schäfer, K., Neels, J. G., Dellas, C. & Loskutoff, D. J. Inhibition of endogenous leptin protects mice from arterial and venous thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 2196–2201 (2004).
289. Nakata, M., Yada, T., Soejima, N. & Maruyama, I. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes* **48**, 426–429 (1999).
290. Dellas, C. *et al.* Leptin signalling and leptin-mediated activation of human platelets: importance of JAK2 and the phospholipases C $\gamma$ 2 and A2. *Thromb. Haemost.* **98**, 1063–1071 (2007).
291. Adams, M. A., Bobik, A. & Korner, P. I. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. *Hypertension* **14**, 191–202 (1989).
292. McGuire, P. G. & Twietmeyer, T. A. Aortic endothelial junctions in developing hypertension. *Hypertension* **7**, 483–490 (1985).
293. Smith, T. L. & Hutchins, P. M. Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. *Hypertension* **1**, 508–517 (1979).
294. Folkow, B. Early structural changes in hypertension: pathophysiology and clinical consequences. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22 Suppl 1**, S1–6 (1993).
295. Ouvrard-Pascaud, A. *et al.* Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. *Circulation* **111**, 3025–3033 (2005).
296. Bleich, M. *et al.* Rescue of the mineralocorticoid receptor knock-out mouse. *Pflugers Arch.* **438**, 245–254 (1999).
297. Messaoudi, S. *et al.* Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo. *Hypertension* **61**, 361–367 (2013).
298. Favre, J. *et al.* Coronary endothelial dysfunction after cardiomyocyte-specific mineralocorticoid receptor overexpression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, H2035–2043 (2011).
299. Le Menuet, D., Munier, M., Meduri, G., Viengchareun, S. & Lombès, M. Mineralocorticoid receptor overexpression in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes increases their beating frequency. *Cardiovasc. Res.* **87**, 467–475 (2010).
300. Lothar, A. *et al.* Ablation of mineralocorticoid receptors in myocytes but not in fibroblasts preserves cardiac function. *Hypertension* **57**, 746–754 (2011).
301. Fraccarollo, D. *et al.* Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction. *Circulation* **123**, 400–408 (2011).
302. Beck, B., Burlet, A., Nicolas, J. P. & Burlet, C. Hyperphagia in obesity is associated with a central peptidergic dysregulation in rats. *J. Nutr.* **120**, 806–811 (1990).
303. Regnault, V., Rivat, C., Pfister, M. & Stoltz, J. F. Monoclonal antibodies against human plasma protein C and their uses for immunoaffinity chromatography. *Thromb. Res.* **63**, 629–640 (1991).
304. Ninivaggi, M. *et al.* Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. *Clin. Chem.* **58**, 1252–1259 (2012).
305. Battle, T., Arnal, J. F., Challah, M. & Michel, J. B. Selective isolation of rat aortic wall layers and their cell types in culture--application to converting enzyme activity measurement. *Tissue Cell* **26**, 943–955 (1994).



306. Chen, Y.-J. *et al.* Adiponectin inhibits tissue factor expression and enhances tissue factor pathway inhibitor expression in human endothelial cells. *Thromb. Haemost.* **100**, 291–300 (2008).
307. Brilakis, E. S., Patel, V. G. & Banerjee, S. Medical management after coronary stent implantation: a review. *JAMA* **310**, 189–198 (2013).
308. Ingelsson, E., Arnlöv, J., Lind, L. & Sundström, J. Metabolic syndrome and risk for heart failure in middle-aged men. *Heart* **92**, 1409–1413 (2006).
309. Paul, W., Queen, L. R., Page, C. P. & Ferro, A. Increased platelet aggregation in vivo in the Zucker Diabetic Fatty rat: differences from the streptozotocin diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 105–111 (2007).
310. Schäfer, A. *et al.* Increased platelet activation in young Zucker rats with impaired glucose tolerance is improved by acarbose. *Thromb. Haemost.* **92**, 97–103 (2004).
311. Schäfer, A. *et al.* The cannabinoid receptor-1 antagonist rimonabant inhibits platelet activation and reduces pro-inflammatory chemokines and leukocytes in Zucker rats. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 1047–1054 (2008).
312. Park, B.-J. *et al.* The relationship of platelet count, mean platelet volume with metabolic syndrome according to the criteria of the American Association of Clinical Endocrinologists: a focus on gender differences. *Platelets* **23**, 45–50 (2012).
313. Jesri, A., Okonofua, E. C. & Egan, B. M. Platelet and white blood cell counts are elevated in patients with the metabolic syndrome. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **7**, 705–711; quiz 712–713 (2005).
314. Diamant, M. *et al.* Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* **106**, 2442–2447 (2002).
315. Fibrinogen Studies Collaboration *et al.* Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA* **294**, 1799–1809 (2005).
316. Folsom, A. R., Conlan, M. G., Davis, C. E. & Wu, K. K. Relations between hemostasis variables and cardiovascular risk factors in middle-aged adults. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Ann Epidemiol* **2**, 481–494 (1992).
317. Herbert, J. M., Bernat, A. & Chatenet-Duchène, L. Effect of ciprofibrate on fibrinogen synthesis in vitro on hepatoma cells and in vivo in genetically obese Zucker rats. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **10**, 239–244 (1999).
318. Fall, T. *et al.* The role of adiposity in cardiometabolic traits: a mendelian randomization analysis. *PLoS Med.* **10**, e1001474 (2013).
319. Neves, M. F., Kasal, D. A. B., Cunha, A. R. & Medeiros, F. Vascular dysfunction as target organ damage in animal models of hypertension. *Int J Hypertens* **2012**, 187526 (2012).
320. D'Uscio, L. V., Barton, M., Shaw, S., Moreau, P. & Lüscher, T. F. Structure and function of small arteries in salt-induced hypertension: effects of chronic endothelin-subtype-A-receptor blockade. *Hypertension* **30**, 905–911 (1997).
321. Delles, C. *et al.* Impaired endothelial function of the retinal vasculature in hypertensive patients. *Stroke* **35**, 1289–1293 (2004).
322. Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z. & Michel, J.-B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc. Res.* **95**, 194–204 (2012).
323. Touyz, R. M., El Mabrouk, M., He, G., Wu, X. H. & Schiffrin, E. L. 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.* **84**, 505–515 (1999).
324. Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.-M. & Toti, F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 15–26 (2011).

325. Baumann, M. *et al.* Prehypertensive renin-angiotensin-aldosterone system blockade in spontaneously hypertensive rats ameliorates the loss of long-term vascular function. *Hypertens. Res.* **30**, 853–861 (2007).
326. Marzolla, V. *et al.* The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 281–288 (2012).
327. Centelles, M. N. *et al.* Blocking endothelial protein C receptor (EPCR) accelerates thrombus development in vivo. *Thromb. Haemost.* **103**, 1239–1244 (2010).
328. Caprio, M. *et al.* Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome. *Endocrinology* **152**, 113–125 (2011).
329. Zannad, F. *et al.* Is thrombosis a contributor to heart failure pathophysiology? Possible mechanisms, therapeutic opportunities, and clinical investigation challenges. *Int. J. Cardiol.* **167**, 1772–1782 (2013).
330. Preston, R. J. S. *et al.* Platelet factor 4 impairs the anticoagulant activity of activated protein C. *J. Biol. Chem.* **284**, 5869–5875 (2009).
331. Störk, S. *et al.* Low levels of adiponectin predict worsening of arterial morphology and function. *Atherosclerosis* **194**, e147–153 (2007).
332. Restituto, P., Colina, I., Varo, J. J. & Varo, N. Adiponectin diminishes platelet aggregation and sCD40L release. Potential role in the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E1072–1077 (2010).

## **XI. ARTICLES ET COMMUNICATIONS EN CONGRES**

### **Articles scientifique :**

Opposite predictive value of pulse pressure and aortic pulse wave velocity on heart failure with reduced left ventricular ejection fraction.

Regnault V, **Lagrange J**, Pizard A, Safar M, Fay R, Pitt B, Challande P, Rossignol P, Zannad F, Lacolley P.

Article accepté dans HYPERTENSION

Endothelial mineralocorticoid receptor activation enhances endothelial protein C receptor and decrease vascular thrombosis

**Lagrange J**, Bourhim M, Fassot C, Louis H, Nguyen Dinh Cat A, Parlakian A, Wahl D, Lacolley P, Jaisser F, Regnault V.

Article en revision dans FASEB

Vascular smooth muscle cells are responsible for a prothrombotic phenotype of spontaneously hypertensive rat arteries

Ait-Aissa K, **Lagrange J**, Max J-P, Louis H, Houppert B, Benetos A, Challande P, Walh D, Regnault V, Lacolley P

Article soumis à Cardiovascular research

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

Mao XQ, Ait-Aissa K, **Lagrange J**, Youcef G, Louis L.

Article publié dans Bio-medical materials and engineering. 2012;22(1-3):35-48.

Propriétés pro- et anti-coagulantes associées aux cellules musculaires lisses vasculaires.

**Lagrange J**, Ait-Aissa K, Walh D, Lacolley P, Regnault V

Article en révision dans Hématologie.

**Communications en congrès.****Communications orales :**

**Lagrange J**, Fassot C, Nguyen Dinh Cat A, Lacolley P, Jaisser F, Regnault V. Implication paradoxale du récepteur minéralocorticoïde endothélial dans l'activation plaquettaire et la thrombose chez la souris.  
Printemps de la cardiologie, Lyon, 12-14 mai 2011

**Lagrange J**, Ait-Aissa K, Max JP, Lacolley P, Regnault V. Respective roles of metabolic syndrome and aging on thrombin generation in Zucker rats.  
Printemps de la cardiologie, Bordeaux, 12-13 avril 2012

**Lagrange J**, Louis H, Max JP, Thornton SN, Wahl D, Fève B, Benetos A, Lacolley P, Regnault V. Implication respective du syndrome métabolique et u vieillissement dans la génération de thrombine.  
Journée de l'école doctorale BioSE, Nancy, 22 mai 2013

**Lagrange J**, Bourhim M, Fassot C, Nguyen Dinh Cat A, Wahl D, Lacolley P, Jaisser F, Regnault V. Aldosterone decreases thrombin generation via enhancement of thrombomodulin-mediated protein C activation.  
XXIV congress of the international society on thrombosis and haemostasis, Amsterdam, 29 juin-4 juillet 2013

**Communications affichées :**

**Lagrange J**, Fassot C, Nguyen Dinh Cat A, Lacolley P, Jaisser F, Regnault V. Implication paradoxale du récepteur minéralocorticoïde endothélial dans l'activation plaquettaire et la thrombose chez la souris.  
Printemps de la cardiologie, Lyon, 12-14 mai 2011

**Lagrange J**, Fassot C, Nguyen Dinh Cat A, Lacolley P, Jaisser F, Regnault V. Paxadoxical involvement of the endothelial mineralocorticoid receptor in platelet activation and vascular thrombosis in mousse.  
ARTERY Paris, 13-15 octobre 2011

**Lagrange J**, Ait-Aissa K, Max JP, Lacolley P, Regnault V. Rôle respectifs du syndrome métabolique et de l'âge dans la génération de thrombine du rat Zucker.  
Journée Claude Huriet de la recherche Biomédicale, Nancy, 2 mars 2012

**Lagrange J**, Ait-Aissa K, Max JP, Lacolley P, Regnault V. Respective roles of metabolic syndrome and aging on thrombin generation in Zucker rats.  
Printemps de la cardiologie, Bordeaux, 12-13 avril 2012

**Lagrange J**, Benetos A, Walton L, Cruickshank K, Lacolley P, Regnautl V. Increased thrombin generation and vascular remodeling in obese Zucker rats.  
ARTERY, Vienne, 18-20 octobre 2012

**Lagrange J**, Bourhim M, Fassot C, Nguyen Dinh Cat A, Wahl D, Lacolley P, Jaisser F, Regnault V. Contrôle de l'activation de la protéine C par le récepteur minéralocorticoïde. Printemps de la cardiologie, Marseille, 18-19 avril 2013

**Lagrange J**, Bourhim M, Lacolley P, Regnault V, Zhenlin L. Impact du facteur de transcription SRF sur l'hémostase. Printemps de la cardiologie, Marseille, 18-19 avril 2013

**Lagrange J**, Bourhim M, Fassot C, Nguyen Dinh Cat A, Wahl D, Lacolley P, Jaisser F, Regnault V. Contrôle de l'activation de la protéine C par le récepteur minéralocorticoïde. Journée de la recherche en santé, Nancy, 24 mai 2013

**Lagrange J**, Fassot C, Nguyen Dinh Cat A, Lacolley P, Jaisser F, Regnault V. Overexpression of the endothelial mineralocorticoid receptor induces a paradoxical decrease in platelet activation and vascular thrombosis in mice. Annual ESAC France-Germany, Paris, 13-14 décembre 2011

**Lagrange J**, Louis H, Max JP, Thornton SN, Wahl D, Fève B, Benetos A, Lacolley P, Regnault V. Increased fibrinogen rises thrombin generation and fibrin clot formation in obese Zucker rats. XXIV congress of the international society on thrombosis and haemostasis, Amsterdam, 29 juin-4 juillet 2013

**Lagrange J**, Walton L, Bloemen S, Cruicksank K, Benetos A, Lacolley P, Regnault V. Arterial stiffness and haemostasis changes in obese Zucker rats. ARTERY Londres 2013

## RESUME

L'allongement de l'espérance de vie a fait de l'insuffisance cardiaque (IC) l'un des problèmes majeurs de santé publique. Le syndrome métabolique (SMet) et l'hypertension sont deux facteurs parmi les plus importants conduisant à l'IC.

Les modifications qui interviennent au niveau structural et cellulaire de la paroi artérielle dans le SMet, l'hypertension et l'IC pourraient entraîner des anomalies de l'hémostase qui aggravent ces tableaux cliniques. Nous avons montré au cours de ce travail les modifications du phénotype de l'hémostase dans différents modèles animaux de pathologies impliquées dans la mise en place de l'IC.

L'altération de l'hémostase précède les modifications fonctionnelles de la paroi et pourrait favoriser le développement de l'IC chez le rat Zucker. Le modèle de rat spontanément hypertendu SHR présente une hypercoagulabilité de la paroi via les cellules musculaires lisses. Ces résultats ne permettent pas d'impliquer uniquement l'hypertension artérielle dans l'hypercoagulabilité plasmatique trouvée chez le rat Zucker. L'activation du récepteur à l'aldostérone au niveau endothélial chez la souris induit un phénotype antithrombotique provoqué par une augmentation de la réactivité du système anticoagulant de la protéine C, via son récepteur, l'EPCR. L'étude d'une cohorte de patients insuffisants cardiaques a permis de distinguer des paramètres de fonction cardiaque et de rigidité artérielle. Cette caractérisation est indispensable pour comprendre les mécanismes des événements thrombotiques associés à l'IC.

La conclusion de ce travail est que les pathologies pouvant conduire à la mise en place d'une IC modifient l'hémostase vers un état d'hypercoagulabilité qui fait intervenir la paroi artérielle.

**Mots clés :** paroi artérielle, génération de thrombine, hémostase, récepteur minéralocorticoïde, insuffisance cardiaque.

## ABSTRACT

Increasing life span has made heart failure (HF) a major issue for public health. The metabolic syndrome (MetS) and hypertension are two important factors which can lead to HF.

Structural and cellular modification occurring in the arterial wall in the MetS, hypertension and HF may provoke hemostasis alterations that can worsen the clinical situation. We have shown in this work, hemostasis modifications in animal models of pathologies implicated in HF development.

Hemostasis alterations were shown to precede functional modifications of the arterial wall and could favor HF development in Zucker rats. Spontaneously hypertensive rats showed an arterial wall hypercoagulability via smooth muscle cells. These results don't permit the implication of hypertension in the hypercoagulable state found in the Zucker rat. A mouse model with aldosterone receptor activation in the endothelium lead to a hypocoagulable state by increasing the protein C anticoagulant system via his receptor, the EPCR. Studying a human HF patient cohort permitted the measurement of cardiac function and of arterial stiffness parameters. This characterization is important to understand thrombosis events associated with HF in humans.

The general conclusion of this work is that, in pathologies leading to HF, modification of hemostasis to a procoagulable state, implicates the arterial wall.

**Key Words:** arterial wall, thrombin generation, hemostasis, mineralocorticoid receptor, heart failure.

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential,  
intended for journal review purposes only, and not to be further  
disclosed.

URL: <http://hype-submit.aha-journals.org>

Title: OPPOSITE PREDICTIVE VALUE OF PULSE PRESSURE AND AORTIC  
PULSE

WAVE VELOCITY ON HEART FAILURE WITH REDUCED LEFT  
VENTRICULAR  
EJECTION FRACTION.

Manuscript number: HYPE201302046

Author(s): Patrick Lacolley, Inserm, U1116

Veronique Regnault, Inserm, U1116

Jeremy Lagrange, Inserm, U1116

Anne Pizard, INSERM 961

Michel Safar, Université Paris Descartes

Renaud Fay, INSERM, Centre d'Investigation Clinique CIC-P 9501,

Nancy, F-54000 France

Bertram Pitt, University of Michigan, Ann Arbor, MI

Pascal Challande, Université Pierre et Marie Curie - UPMC

Patrick Rossignol, CHU Nancy & Université de Lorraine & INSERM

Faiez Zannad, Inserm, Université de Lorraine and CHU, Nancy, France

For Hypertension Peer Review. Do not distribute.  
Destroy after use.



**OPPOSITE PREDICTIVE VALUE OF PULSE PRESSURE AND AORTIC PULSE WAVE VELOCITY ON HEART FAILURE WITH REDUCED LEFT VENTRICULAR EJECTION FRACTION.**

**Insights from an EPHEBUS (Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study) substudy**

Veronique Regnault<sup>1,2,\*</sup>, Jérémy Lagrange<sup>1,2,\*</sup>, Anne Pizard<sup>1,2,\*</sup>, Michel Safar<sup>3</sup>,

Renaud Fay<sup>4</sup>, Bertram Pitt<sup>5</sup>, Pascal Challande<sup>6</sup>,

Patrick Rossignol<sup>1,2,4,7</sup>, Faiez Zannad<sup>1,2,4,7</sup>, Patrick Lacolley<sup>1,2,7</sup>

\* share first authorship

<sup>1</sup>INSERM, U1116, Vandoeuvre-les-Nancy, France

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

<sup>3</sup>Centre de Diagnostic, Hôtel-Dieu, Paris, France

<sup>4</sup>INSERM, Centre d'Investigations Cliniques 9501, Nancy, France

<sup>5</sup>University of Michigan, School of Medicine, Ann Arbor, Michigan, USA

<sup>6</sup>UPMC Université Paris 06; CNRS, UMR 7190, Paris, France

<sup>7</sup>CHU Nancy, Pole de Cardiologie, Institut Lorrain du Coeur et des Vaisseaux, Nancy, France

Short title: Markers of arterial stiffness in heart failure

Text: 5408 words including references, figures and legends

Abstract: 240 words

Corresponding author: Patrick Lacolley; Inserm U1116, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France; Tel 33 3 83683621, Fax 33 3 83683639; mail: Patrick.Lacolley@nancy.inserm.fr

## **Abstract**

Whereas hypertension contributes significantly to worsen cardiovascular risk, blood pressure (BP) increment in subjects with heart failure (HF) is paradoxically associated with a lower risk. The objective was to determine whether pulse pressure (PP) and pulse wave velocity (PWV) remain prognostic markers independently of treatment in heart failure with reduced left ventricular function.

The investigation involved 6632 patients of the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study. All subjects had acute myocardial infarction with left ventricular ejection fraction (LVEF) below 40% and signs/symptoms of HF. Carotid-femoral PWV was measured in a subpopulation of 306 subjects.

In the overall population, baseline mean arterial pressure lower than 90 mmHg was associated with higher all-cause death [HR: 1.15 (95% CI 1.01-1.31),  $p < 0.05$ ] whereas higher LVEF or PP were associated with lower rates of all-cause death, cardiovascular death/hospitalization and cardiovascular death. In the subpopulation, increased baseline PWV was associated with worse outcomes (all-cause death [1.16 (1.03-1.30,  $p < 0.05$ )], and cardiovascular deaths [1.16 (1.03-1.31),  $p < 0.05$ ], independently from age and LVEF. Using multiple regression analysis, SBP and age were the main independent factors positively associated with PP or PWV, both in the entire population or the PWV substudy.

In HF and low ejection fraction, our results suggest that PP, being negatively associated with outcome is more dependent on left ventricular function and thereby no longer a marker of aortic elasticity. In contrast, increased aortic stiffness, assessed by PWV, contributes significantly to cardiovascular death.

**Key words:** heart failure; arterial stiffness; pulse pressure; pulse wave velocity; ejection fraction; cardiovascular risk; hypertension

For Hypertension Peer Review. Do not distribute.  
Destroy after use.

## **Introduction**

Cardiovascular (CV) physiologists have suggested that blood pressure (BP) may be adequately investigated when divided into two components: a steady component, mean arterial pressure (MAP), and a pulsatile component, pulse pressure (PP).<sup>1-4</sup> At a given left ventricular ejection fraction (LVEF), the steady component, which corresponds to steady flow, as delivered theoretically by a steady pump (here, the heart) relates to the status of small arteries, i.e. total vascular resistance, the ratio between MAP and blood flow. On the other hand, PP, which corresponds to the pulsatile flow really ejected by the heart, is mainly influenced by two major and distinct factors: again LVEF, but also aortic stiffness. While MAP is associated with overall CV risk (involving brain and kidney), PP is rather associated almost exclusively with cardiac, and mainly coronary risk. This simple description has the advantage to show that, in hypertensive subjects, it is important to study separately not only the relationships between MAP and PP, but also the respective role of LVEF and aortic stiffness, the 2 major determinants of PP. Excessive arterial pulsatility resulting from increased arterial stiffness contributes to abnormal ventricular arterial coupling.

In this context, past epidemiological investigations with baseline assessment of blood pressure and LVEF have considered that hypertension, used as a categorical variable, is one of the most important factor contributing to the progression of overall and CV risk.<sup>5</sup> In patients with heart failure (HF), there is a relatively small number of studies that have been published and recently meta-analysed.<sup>6</sup> Mortality is highest when systolic BP (SBP) is below 100 mmHg or above 160 mmHg.<sup>7,8</sup> Within the SBP margin of 100-160 mmHg, higher BP were independently associated with lower mortality. Furthermore, On another hand, Tartiére et al and Weber et al<sup>9,10</sup> showed

that, in middle aged and old hypertensive subjects, increased arterial stiffness and wave reflections might be independently associated with impaired systolic or diastolic function. These findings suggest that, in HF, in order to evaluate the relationships between BP and outcome, it is necessary, not only to determine the level of LVEF, but also to take into account the degree of aortic stiffness.<sup>11,12</sup>

In the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) trial,<sup>13</sup> baseline LVEF was available in the totality of the population, and was below 40%. Eplerenone reduced significantly the rate of death due to progressive HF and sudden death, as well as the rate of hospitalization for HF.<sup>13,14</sup> In a post hoc analysis, it was found that In patients without history of hypertension, eplerenone reduced heart failure hospitalization but had no effect on mortality or on the composite end point,<sup>12</sup> while in patients with a history of hypertension all outcome endpoints were influenced favorably by eplerenone, ,

The objective of the study was to determine whether hemodynamic factors related to arterial stiffness (PP and PWV) remain prognostic markers independently of treatment in heart failure with reduced LVEF.

## **Methods**

### ***Study design and patient populations***

The design and main results of the EPHESUS trial have been reported previously.<sup>13</sup> EPHESUS enrolled patients with HF in the setting of acute myocardial infarction complicated by left ventricular systolic dysfunction (ejection fraction  $\leq 40\%$ ). HF had to be documented by at least one of the following: presence of pulmonary rales, chest radiography showing pulmonary venous congestion, or the presence of a third heart sound. Patients were entered into the study at any point from 3-14 days after

the infarction. Patients with diabetes mellitus were not required to have evidence of HF. All patients were randomly assigned to treatment with eplerenone 25 mg daily or placebo, for the first month and up-titrated to 50 mg/day or placebo, depending on serum potassium levels. Treatment with eplerenone was given in addition to standard medical therapy, which could include angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers (ACEI, ARB), beta blockers, diuretics, aspirin, statins, as well as coronary reperfusion therapy. EPHEUS was an event-driven study and the mean duration of follow-up was 16 months.

Among the 6632 patients enrolled in the EPHEUS study, 19 were excluded from the present analysis because of unavailable blood pressure data at baseline. Standard brachial routine clinical sphygmomanometer blood pressure measurements were performed during each patient visit. In the present study, we defined two patient subgroups, in which the terms normotension and hypertension were used exclusively as qualitative variables. Normotensive patients were defined as having no past history of hypertension and baseline SBP < 140 and DBP < 90 mmHg. Hypertensive patients were composed of all the remaining patients, either controlled or uncontrolled with drug treatment. Moreover, in a substudy, 306 patients had a baseline PWV assessment, using Complior device, as previously described.<sup>15</sup> Global design is indicated in a specific flow-chart (Figure).

### ***Statistical analysis***

Analyses were performed using SAS V9.22 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The two-tailed significance level was set to  $p < 0.05$ . Univariate analyses were carried out using the Mann-Whitney and Chi-square tests. Summary statistics were presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $m \pm SD$ ) for continuous variables and frequency (percent) for categorical variables. In multivariable analyses, 17 baseline covariables were

tested: study drug, hypertension, gender, age, BP measurements (SBP; diastolic BP, DBP; MAP; PP, each separately), heart rate, LVEF, blood potassium, estimated glomerular filtration rate (eGFR), reperfusion therapy, angiotensin converting enzyme inhibitors and/or angiotensin receptors blockers (ACEI/ARB), beta-blockers, diuretics (loop or others) and nitrates. PWV was additionally tested in the subgroup of patients with available data. Only significant factors were kept in the final models if not otherwise specified. Association of these covariables with all-cause mortality, cardiovascular death or hospitalization and cardiovascular death was analyzed using Cox regression. Results were presented as hazard ratios and 95% confidence interval (HR [95CI]). Factors associated with PP and PWV were identified using multivariable linear regression. Results are reported as regression coefficient  $\pm$  standard error of estimate (SEE). Variance explained independently by the significant factors was estimated as squared semipartial correlation coefficients computed using Type II sums of squares. Adjustment of mean PWV on age and MAP was carried out using ANOVA. The validity of the multivariate models was thoroughly checked: proportionality of hazards (Cox regression), normality of the residuals distribution and homoscedasticity (linear regression and ANOVA), linearity of the associations, absence of collinearity and interaction.

## **Results**

### ***Baseline characteristics of the patients***

The whole study was composed of 4702 men (59.5% were hypertensive) and 1911 women (75% were hypertensive). The substudy population with available PWV includes 225 men (59% were hypertensives) and 81 women (74 % were hypertensives). Table 1 shows the characteristics of the whole population and

substudy of patients with measurement of PWV. PP and LVEF were similar in both populations. PWV values were significantly higher in hypertensive than in normotensive patients.

### ***Opposite effects of baseline PP and PWV on outcomes***

Increasing age and reduction of eGFR (below 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>) were independent determinants of all-cause death, cardiovascular death/hospitalization and cardiovascular death in the whole study population (Table 2). Moreover, MAP lower than 90 mmHg was also associated with increased all-cause death. In contrast, higher levels of LVEF, pulse pressure and eplerenone treatment was associated with lower rates of outcomes. Replacing PP by SBP in the model gave similar results for all-cause death (0.96 (0.94-0.99); p<0.01), cardiovascular death/hospitalization (0.96 (0.94-0.98); p<0.001) and for cardiovascular death (0.96 (0.93-0.98); p<0.01). Finally, notwithstanding the colinearity between SBP, PP, and MAP, we performed a sensitivity analysis including all three parameters in the multivariate models, and observed that neither MAP nor SBP were found associated with the tested outcomes, whereas PP remained significantly associated with lower rate of all-cause death (p=0.034) and cardiovascular death (p= 0.048).

In the PWV substudy population, increased PWV was found associated with worse outcomes (all cause death, which almost exclusively corresponded to cardiovascular deaths), independently from age and ejection fraction.

### ***Factors associated with baseline PP and PWV***

Using multiple regression analysis in the entire population, we showed that SBP was the main positively independently associated factor, accounting for 53.8% of the PP



variance in a model explaining 61.0% of the PP variance (Table 3). This analysis also showed that age, was positively associated with PP whereas haematocrit, heart rate, and LVEF were negatively associated.

In the PWV study, SBP also accounted for 55.3% of PP variance and age remained independently associated with PP in a model explaining 68.2% of the PP variance. The factors SBP and age were also positively associated with PWV and explained 2.4% and 13.0% on a total of 20.1% of the PWV variations respectively. In this population, 2.6 and 11.2% on a total of 20.2% of the variance in PWV was explained by a multiple regression in which PP and age were included as covariates.

## **Discussion**

We demonstrated that PP and PWV are independent opposite prognostic markers. In such population, the increase in PP associated with improves outcomes cannot be considered as an index of arterial stiffness.

An important result of the study was that PP, measured at admission in patients mostly with symptomatic HF and low EF, was a strong independent predictor of overall and CV risk prognosis. High PP is associated with a significant decrement in the overall and CV risk in HF contrary to the general population. This finding was shown even after adjustment for hypertension and MAP and established clinical predictors of adverse outcome. This first observation is reinforced by two main results. First, drugs administered during hospitalization do not affect the prognosis value of PP measured at admission. In our study, all patients were treated with or without eplerenone in addition to standard medical therapy but it was not the aim of the study to focus on the effects of treatment. Second, in this study, MAP is a parameter associated with the occurrence of poor overall outcomes for all cause

death.

PP is thought to be determined by cardiac function and arterial stiffness through wave reflections.<sup>10</sup> Increased central arterial stiffening is a hallmark of the aging process and the consequence of many disease states such as diabetes, atherosclerosis, and chronic renal compromise. Large-artery stiffness is the main determinant of PP. Aortic stiffness has independent predictive value for total and cardiovascular mortality, coronary morbidity and mortality, and fatal stroke in patients with essential hypertension end-stage renal failure, or diabetes mellitus.<sup>16-18</sup> However, several studies have reported controversial results on the relation between PP and all cause death in HF. In the present study, PP was significantly associated with lower rate of all-cause death and cardiovascular death. In contrast with our data, several studies SOLVD (Studies of Left Ventricular Dysfunction), SAVE (The Survival and Ventricular Enlargement trial) and CAPRICORN (the Carvedilol Post-Infarct Survival Control in LV Dysfunction study) showed a positive relation between PP and overall and CV mortality.<sup>19-21</sup> Since a significant proportion of patients in these trials were asymptomatic or qualified as Killip class I, this observation that prognosis worsens with increased PP has been attributed to increased large-vessel stiffness. In line with this, PP was associated with known risk factors for arterial stiffness, such as advanced age, diabetes mellitus, and renal failure, indicating that elevated PP reflects, in part, increased arterial stiffness. However, our study in agreement with VMAC (the Vasodilation in the Management of Acute Congestive HF study), CONFINE (Comorbidities and Outcome in patients with chronic heart Failure: a study in internal medicine units in Italy), PRIME (the Prospective Randomized study of Ibopamine on Mortality and Efficacy), HIJC-HF (Heart Institute of Japan-Department of Cardiology-HF) studies and IN-CHF (Italian Network of Congestive Heart Failure)

registry showed that high PP independently predicts decreased mortality.<sup>22-26</sup> As shown in VMAC study<sup>22</sup> where LVEF increased with tertiles of PP, there was evidence that a relatively preserved left ventricular systolic function is required to maintain an elevated PP. Our results probably reflect that in HF, PP is more dependent on left ventricular function and stroke volume than aortic elasticity.

In fact, PP reflects a complex interaction of the heart and the arterial and venous systems. Cardiac parameters, such as diastolic filling and contractility, affect PP. The dependence of PP on hemodynamic factors (e.g., stroke volume and peak aortic blood flow) other than aortic and peripheral conduit vessel stiffness per se makes it an imperfect indicator of conduit vessel function. In line with this, several groups have reported that patients with HF and preserved LVEF have increased central aortic stiffness relative to age-matched healthy and hypertensive subjects without HF.<sup>27,28</sup> Only one study in HF and LVEF below 45% revealed that PWV predicts adverse clinical outcomes.<sup>29</sup> Such alterations suggest that abnormal ventricular-vascular coupling may contribute to the pathophysiology of HF with preserved ejection fraction and even may become especially important in the setting of severe decompensated HF, in which significant correlations between PWV and LVEF have not been observed. Because PP results from cardiac and arterial factors, the relationship that we observed in this study between reduced PP and mortality might be a consequence of LVEF impairment leading to a decrease in stroke volume and rate of ejection. However, the adverse prognosis associated with reduced PP was independent of baseline LVEF, indicating that a low PP is not simply a marker of a low LVEF at rest. We speculate that a low PP in the setting of clinical decompensation represents more advanced CV alterations, probably with most profound LV and peripheral hemodynamic changes.

Because of ventricular-vascular interaction in HF, aortic PWV, a key measure of arterial stiffness is altered in this disease.<sup>9,30,31</sup> A limitation of our PWV substudy population is an insufficient power to highlight the role of PP as an independent predictor of clinical events, in the substudy patient subset. Nevertheless, the number of patients was sufficient to show that increased PWV was associated with worse outcomes independently from age and ejection fraction. Arterial stiffness exerts deleterious effects on the heart, including increased afterload and myocardial oxygen demand, impaired ventricular relaxation, and subendocardial ischemia.

We next investigate which were the determinants of PP and PWV. We found that SBP was the main determinant of PP but not of PWV in the PWV substudy population. Despite a strong positive association using an univariate analysis, multivariate analysis showed that LVEF was a negative determinant of PP but explaining only 0.2% of variance of PP. There was no significant correlation between LVEF and PWV, suggesting that, during the course of HF, both factors participated independently to PP level. The significant determinants of PWV were age, SBP or PP but its main factors such as geometry and structure of the aortic wall have not been measured in this study.

### **Perspectives**

In this study, PP is no longer a surrogate marker of arterial stiffness in HF whereas PWV remains a valid measure arterial stiffness and is associated with increased CV risk in this setting. PP and PWV are non redundant parameters exploring complementary evaluation of cardiac and vascular functions in HF. These observations suggest that the prognostic significance of elevated PP may not be similar in the full spectrum of patients with HF. In compensated HF, elevated PP may

reflect, in part, increased large-vessel stiffness and therefore may be associated with increased risk. In contrast, in the setting of severe decompensated systolic HF, survival was shortened in patients with decreased PP or improved in those with increased PP. Here two factors are important to consider. First, SBP plays a major prognosis contribution, and future investigations are required to determine whether this acts through its peak level or through its role as a major pathway for reflectance properties. Second, the two major factors predicting mortality are LVEF and PWV. Finally, measure of PWV may allow a better assessment of the effect of beneficial existing therapeutic agents such as eplerenone on arterial stiffness for future longitudinal studies.

### **Acknowledgments**

The authors thank Simon Thornton for editing this manuscript.

### **Sources of funding**

The EPHESUS study was funded by Pfizer, Inc..

### **Disclosures**

B. Pitt and F. Zannad have received honoraria from and served on advisory boards for Pfizer, Inc. The other authors report no conflicts.

## **REFERENCES**

1. Avolio AP, Van Bortel LM, Boutouyrie P, Cockcroft JR, McEniery CM, Protogerou AD, Roman MJ, Safar ME, Segers P, Smulyan H. Role of pulse

pressure amplification in arterial hypertension: experts' opinion and review of the data. *Hypertension*. 2009;54:375-383.

2. Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *J Appl Physiol*. 2008;105:1652-1660.
3. Safar ME, Lacolley P. Disturbance of macro- and microcirculation: relations with pulse pressure and cardiac organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1-7.
4. Stergiopoulos N, Westerhof N. Determinants of pulse pressure. *Hypertension*. 1998;32:556-559.
5. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:30-41.
6. Berry C, Doughty RN, (MAGGIC). ftM-aGGiCHF. The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. *Eur Heart J*. 2012;33:1750-1757.
7. Lee DS, Ghosh N, Floras JS, Newton GE, Austin PC, Wang X, Liu PP, Stukel TA, Tu JV. Association of blood pressure at hospital discharge with mortality in patients diagnosed with heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009;2:616-623.
8. Raphael CE, Whinnett ZI, Davies JE, Fontana M, Ferenczi EA, Manisty CH, Mayet J, Francis DP. Quantifying the paradoxical effect of higher systolic blood pressure on mortality in chronic heart failure. *Heart*. 2009;95:56-62.

9. Tartiere JM, Logeart D, Safar ME, Cohen-Solal A. Interaction between pulse wave velocity, augmentation index, pulse pressure and left ventricular function in chronic heart failure. *J Hum Hypertens*. 2006;20:213-219.
10. Weber T, O'Rourke MF, Ammer M, Kvas E, Punzengruber C, Eber B. Arterial stiffness and arterial wave reflections are associated with systolic and diastolic function in patients with normal ejection fraction. *Am J Hypertens*. 2008;21:1194-1202.
11. Ahmed A, Pitt B. A history of systemic hypertension and incident heart failure hospitalization in patients with acute myocardial infarction and left ventricular systolic dysfunction. *Am J Cardiol*. 2009;103:1374-1380.
12. Pitt B, Ahmed A, Love TE, Krum H, Nicolau J, Cardoso JS, Parkhomenko A, Aschermann M, Corbalan R, Solomon H, Shi H, Zannad F. History of hypertension and eplerenone in patients with acute myocardial infarction complicated by heart failure. *Hypertension*. 2008;52:271-278.
13. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;348:1309-1321.
14. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*. 2011;364:11-21.

15. Salvi P, Magnani E, Valbusa F, Agnoletti D, Alecu C, Joly L, Benetos A. Comparative study of methodologies for pulse wave velocity estimation. *J Hum Hypertens*. 2008;22:669-677.
16. Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension*. 2005;45:1050-1055.
17. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27:2588-2605.
18. Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:932-943.
19. Domanski MJ, Mitchell GF, Norman JE, Exner DV, Pitt B, Pfeffer MA. Independent prognostic information provided by sphygmomanometrically determined pulse pressure and mean arterial pressure in patients with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:951-958.
20. Mitchell GF, Moya LA, Braunwald E, Rouleau JL, Bernstein V, Geltman EM, Flaker GC, Pfeffer MA. Sphygmomanometrically determined pulse pressure is a powerful independent predictor of recurrent events after myocardial infarction in patients with impaired left ventricular function. SAVE investigators. Survival and Ventricular Enlargement. *Circulation*. 1997;96:4254-4260.
21. Petrie CJ, Voors AA, Robertson M, van Veldhuisen DJ, Dargie HJ. A low pulse pressure predicts mortality in subjects with heart failure after an acute



- myocardial infarction: a post-hoc analysis of the CAPRICORN study. *Clin Res Cardiol.* 2012;101:29-35.
22. Aronson D, Burger AJ. Relation between pulse pressure and survival in patients with decompensated heart failure. *Am J Cardiol.* 2004;93:785-788.
  23. Biagi P, Gussoni G, Iori I, Nardi R, Mathieu G, Mazzone A, Panuccio D, Scanelli G, Cicatello C, Rinollo C, Muriago M, Galasso D, Bonizzoni E, Vescovo G. Clinical profile and predictors of in-hospital outcome in patients with heart failure: the FADOI "CONFINE" Study. *Int J Cardiol.* 2011;152:88-94.
  24. Kawashiro N, Kasanuki H, Ogawa H, Matsuda N, Hagiwara N. Clinical characteristics and outcome of hospitalized patients with congestive heart failure: results of the HIJC-HF registry. *Circ J.* 2008;72:2015-2020.
  25. Schillaci G, Di Luzio S, Coluccini M, Gonzini L, Porcu M, Pozzar F, Maggioni AP. A low pulse pressure is an independent predictor of mortality in heart failure: data from a large nationwide cardiology database (IN-CHF Registry). *Ital Heart J.* 2004;5:892-898.
  26. Voors AA, Petrie CJ, Petrie MC, Charlesworth A, Hillege HL, Zijlstra F, McMurray JJ, van Veldhuisen DJ. Low pulse pressure is independently related to elevated natriuretic peptides and increased mortality in advanced chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2005;26:1759-1764.
  27. Desai AS, Mitchell GF, Fang JC, Creager MA. Central aortic stiffness is increased in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *J Card Fail.* 2009;15:658-664.

28. Kitzman DW, Herrington DM, Brubaker PH, Moore JB, Eggebeen J, Haykowsky MJ. Carotid arterial stiffness and its relationship to exercise intolerance in older patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Hypertension*. 2013;61:112-119.
29. Bonapace S, Rossi A, Cicoira M, Targher G, Valbusa F, Benetos A, Vassanelli C. Increased aortic pulse wave velocity as measured by echocardiography is strongly associated with poor prognosis in patients with heart failure. *J Am Soc Echocardiogr*. 2013;26:714-720.
30. Meguro T, Nagatomo Y, Nagae A, Seki C, Kondou N, Shibata M, Oda Y. Elevated arterial stiffness evaluated by brachial-ankle pulse wave velocity is deleterious for the prognosis of patients with heart failure. *Circ J*. 2009;73:673-680.
31. Radaelli A, Castiglioni P, Balestri G, Cesana F, De Carlini C, Soriano F, Azzellino A, Di Rienzo M, Paolini G, Ferrari AU, Mancia G. Increased pulse wave velocity and not reduced ejection fraction is associated with impaired baroreflex control of heart rate in congestive heart failure. *J Hypertens*. 2010;28:1908-1912.

## **Novelty and significance**

### ***What is new?***

- Pulse pressure and pulse wave velocity are independent opposite prognostic markers in heart failure with reduced ejection fraction: in the setting of severe decompensated systolic heart failure, survival was improved in patients with increased pulse pressure and shortened in those with increased pulse wave velocity.

### ***What is relevant?***

- In heart failure with reduced ejection fraction, pulse pressure cannot be considered as an index of arterial stiffness whereas pulse wave velocity remains a valid measure.

## **Summary**

High pulse pressure, measured at admission, is negatively associated with outcome in heart failure with reduced left ventricular ejection fraction whereas aortic stiffness, assessed by pulse wave velocity, contributes significantly to cardiovascular death, independently of treatment. Pulse pressure is more dependent on left ventricular function and thereby no longer a marker of aortic elasticity.

**Table 1 - Baseline characteristics of the patients**

	Whole study			PWV substudy		
	HTN no N = 2381	HTN yes N = 4232	All N = 6613	HTN no N = 114	HTN yes N = 192	All N = 306
Eplerenone group	1202 (50)	2106 (50)	3308 (50)	61 (54)	86 (45)	147 (48)
Age (years)	61 ± 12	65 ± 11 ‡	64 ± 12	58 ± 11	63 ± 10 ‡	61 ± 11
Race, white	2147 (90)	3820 (90)	5967 (90)	91 (80)	180 (94) ‡	271 (89)
Gender - male	1903 (80)	2799 (66) ‡	4702 (71)	93 (82)	132 (69)	225 (74)
- female	478 (20)	1433 (34) ‡	1911 (29)	21 (18)	60 (31) *	81 (26)
BP (mmHg) - systolic	111 ± 12	124 ± 17 ‡	119 ± 17	109 ± 11	123 ± 15 ‡	118 ± 16
- diastolic	68 ± 9	74 ± 11 ‡	72 ± 11	70 ± 8	77 ± 9 ‡	74 ± 9
- mean	83 ± 9	91 ± 12 ‡	88 ± 11	83 ± 8	92 ± 10 ‡	89 ± 10
- pulse	43 ± 10	49 ± 14 ‡	47 ± 13	39 ± 9	47 ± 13 ‡	44 ± 12
Heart rate (bpm)	75 ± 12	75 ± 12	75 ± 12	74 ± 10	71 ± 9 *	72 ± 9
LVEF (%)	32.8 ± 6.1	33.3 ± 6.0 †	33.1 ± 6.1	34.2 ± 5.5	34.5 ± 5.1	34.4 ± 5.2
PWV (m/s)	-	-	-	11.4 ± 3.0	12.4 ± 3.2 †	12.0 ± 3.1
Previous hosp. for HF	135 (6)	375 (9) ‡	510 (8)	2 (2)	13 (7)	15 (5)
Reperf./revasc. therapy	1255 (53)	1740 (41) ‡	2995 (45)	53 (46)	75 (39)	128 (42)
Symptoms of HF	2031 (86)	3534 (84)	5565 (85)	107 (94)	174 (91)	281 (92)
Potassium (mmol/l)	4.3 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.3 ± 0.5	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.5
Creatinine (mmol/l)	96 ± 25	102 ± 30 ‡	100 ± 29	94 ± 24	98 ± 26	97 ± 26
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	75 ± 23	68 ± 23 ‡	70 ± 23	77 ± 20	71 ± 23 †	73 ± 22
Medical history - AMI	548 (23)	1249 (30) ‡	1797 (27)	23 (20)	54 (28)	77 (25)
- Diabetes	571 (24)	1565 (37) ‡	2136 (32)	21 (18)	66 (34) †	87 (28)
- Heart failure	235 (10)	738 (17) ‡	973 (15)	6 (5)	26 (14) *	32 (10)
- Hypertension	-	4002 (95)	4002 (61)	-	183 (95)	183 (60)
Medications - ACEI/ARB	1987 (83)	3747 (89) ‡	5734 (87)	79 (69)	165 (86) ‡	244 (80)
- Beta-blockers	1790 (75)	3156 (75)	4946 (75)	79 (69)	149 (78)	228 (75)
- Diuretics	1284 (54)	2692 (64) ‡	3976 (60)	45 (39)	105 (55) *	150 (49)
- Aspirin	2094 (88)	3758 (89)	5852 (88)	101 (89)	177 (92)	278 (91)

- Statins	1213 (51)	1871 (44) ‡	3084 (47)	43 (38)	60 (31)	103 (34)
- CCB	258 (11)	806 (19) ‡	1064 (16)	27 (24)	58 (30)	85 (28)
- Anti-arrhythmics	262 (11)	519 (12)	781 (12)	20 (18)	32 (17)	52 (17)
- Digoxin	321 (13)	680 (16) †	1001 (15)	14 (12)	16 (8)	30 (10)
- Nitrates	1298 (55)	2811 (66) ‡	4109 (62)	80 (70)	155 (81) *	235 (77)
- Anticoagulants	338 (14)	768 (18) ‡	1106 (17)	10 (9)	33 (17) *	43 (14)
- Potassium suppl.	353 (15)	730 (17) *	1083 (16)	7 (6)	15 (8)	22 (7)

Results are mean  $\pm$  standard deviation or frequency (percent). \*  $p < 0.05$ , †  $p < 0.01$ , ‡  $p < 0.001$ . HTN: hypertension, defined as  $SBP \geq 140$  and/or  $DBP \geq 90$  mmHg or history of hypertension, BP: blood pressure, LVEF: left ventricle ejection fraction, PWV: pulse wave velocity, eGFR: estimated glomerular filtration rate (MDRD formula), AMI: acute myocardial infarction, ACEI/ARB: angiotensin conversion enzyme inhibitors and/or angiotensin II receptors blockers, CCB: calcium channel blockers. Potassium suppl.: potassium supplements.

**Table 2 - Association of pulse pressure with outcomes**

	All-cause death	Cardiovascular death/hospitalization	Cardiovascular death
<b>Whole population (events/patients)</b>	(1017/6551)	(1824/6454)	(876/6551)
Eplerenone	0.86 (0.76 - 0.98) *	0.87 (0.80 - 0.96) †	0.84 (0.74 - 0.96) *
Age per 5-year increment	1.20 (1.16 - 1.24) ‡	1.15 (1.12 - 1.17) ‡	1.20 (1.16 - 1.24) ‡
PP per 5-mmHg increment	0.96 (0.93 - 0.98) †	0.97 (0.95 - 0.99) ‡	0.95 (0.92 - 0.97) ‡
MAP < 90 mmHg	1.14 (1.00 - 1.30) *	NS	NS
Hematocrit per 5% increment	NS	0.93 (0.89 - 0.98) †	NS
LVEF per 2% increment	0.92 (0.90 - 0.93) ‡	0.92 (0.91 - 0.94) ‡	0.91 (0.89 - 0.93) ‡
eGFR < 60 ml/min/1.73m <sup>2</sup>	1.54 (1.35 - 1.76) ‡	1.43 (1.29 - 1.58) ‡	1.51 (1.31 - 1.74) ‡
<b>PWV substudy (events/patients)</b>	(28/306)	(64/306)	(26/306)
Age per 5-year increment	NS	1.16 (1.03-1.30) *	NS
PWV per m/s increment	1.16 (1.03-1.30) *	NS	1.16 (1.03-1.31) *
LVEF per 2% increment	0.84 (0.75-0.95) †	0.87 (0.81-0.94) ‡	0.84 (0.74-0.95) †

Results are (events/patients) and hazard ratios (95% confidence interval). \*  $p < 0.05$ , †  $p < 0.01$ , ‡  $p < 0.001$ . Baseline covariables tested in the models were study drug, age, gender, pulse pressure, mean arterial pressure (MAP), heart rate, left ventricle ejection fraction (LVEF), blood potassium, estimated glomerular fraction (eGFR, MDRD formula), angiotensin conversion enzyme inhibitors and/or angiotensin II receptors blockers (ACEI/ARB), beta-blockers, diuretics (loop or others), nitrates, plus pulse wave velocity (PWV) in the PWV substudy. Only significant covariables were kept in the above models, except hypertension and standard medical therapy

**Table 3 - Baseline factors associated with pulse pressure and pulse wave velocity**

	Pulse pressure (mmHg)		Pulse wave velocity (m/s)	
	Regression coefficient $\pm$ SE	Variance explained (%)	Regression coefficient $\pm$ SE	Variance explained (%)
<b>Whole population</b>				
SBP (per 5-mmHg increment)	2.92 $\pm$ 0.03 ‡	53.8	-	
Age (per 5-year increment)	0.64 $\pm$ 0.05 ‡	1.2	-	
Haematocrit (per 5% increment)	-1.05 $\pm$ 0.10 ‡	0.7	-	
Heart rate (per 5-bpm increment)	-0.29 $\pm$ 0.04 ‡	0.3	-	
LVEF (per 5% increment)	-0.50 $\pm$ 0.08 ‡	0.2	-	
<i>Total variance explained (unadjusted)</i>		61.0		
<b>PWV substudy</b>				
Model with SBP				
SBP (per 5-mmHg increment)	2.96 $\pm$ 0.13 ‡	55.3	0.16 $\pm$ 0.05 †	2.4
Age (per 5-year increment)	0.80 $\pm$ 0.19 ‡	1.9	0.54 $\pm$ 0.08 ‡	13.0
<i>Total variance explained (unadjusted)</i>		68.2		20.1
Model with PP				
PP (per 5-mmHg increment)	-		0.23 $\pm$ 0.07 ‡	2.6
Age (per 5-year increment)	-		0.52 $\pm$ 0.08 ‡	11.2
<i>Total variance explained (unadjusted)</i>				20.2

SE: standard error of the estimate. Variance explained by each factor: independently from each other.

\*  $p < 0.05$ , †  $p < 0.01$ , ‡  $p < 0.001$ .

Baseline covariables tested in the models were age, gender, SBP, MAP, PP, heart rate, left ventricle ejection fraction (LVEF), blood potassium, estimated glomerular fraction rate (eGFR, from MDRD formula), angiotensin conversion enzyme inhibitors and/or angiotensin II receptors blockers (ACEI/ARB), beta-blockers, nitrates, diuretics (loop or others), plus pulse wave velocity (PWV) in the substudy. Only significant covariables were kept in the above models.

## **Endothelial mineralocorticoid receptor activation enhances endothelial protein C receptor and decreases vascular thrombosis in mice**

Jérémy Lagrange<sup>1,2</sup>, Mustapha Bourhim<sup>1,2\*</sup>, Céline Fassot<sup>4,5\*</sup>, Huguette Louis<sup>1,2</sup>,  
Aurélie Nguyen Dinh Cat<sup>4,5</sup>, Ara Parlakian<sup>5</sup>, Denis Wahl<sup>1,2,3</sup>,  
Patrick Lacolley<sup>1,2,6</sup>, Frédéric Jaisser<sup>4,5,6</sup>, Véronique Regnault<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U1116, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy, France

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

<sup>3</sup>CHU Nancy, Médecine Vasculaire, Nancy, France

<sup>4</sup>INSERM, U872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

<sup>5</sup>Pierre et Marie Curie University, Paris, France

<sup>6</sup>Centre for Clinical Investigation Inserm CIC-P 9501, CHU Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

\* equal contribution

Corresponding author: Veronique Regnault, Inserm U1116, 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](mailto:Veronique.Regnault@inserm.fr)

**Short title:** Role of endothelial MR in thrombin generation

## **Nonstandard abbreviations**

APC, activated protein C

CAT, calibrated automated thrombography

CT, control

EPCR, endothelial protein C receptor

ETP, endogenous thrombin potential

GR, glucocorticoid receptor

HAEC, human aortic endothelial cell

ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1

MR, mineralocorticoid receptor

PPP, platelet-poor plasma

TF, tissue factor

TFPI, tissue factor pathway inhibitor

TM, thrombomodulin

VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1

vWF, von Willebrand factor

WT, wild type



## **Abstract**

Previous studies have shown that aldosterone, which activates the mineralocorticoid receptor (MR), promotes thrombosis in animal models. Our objective was to determine whether MR activation/expression in the vascular endothelium could modify thrombotic risk *in vivo* and to examine thrombin generation at the surface of aortic endothelial cells (HAECs). MR was conditionally overexpressed *in vivo* in the vascular endothelium in mice (MR-EC) or stimulated with aldosterone in aortic endothelial cells (HAECs). Thrombosis after ferric chloride injury was delayed in MR-EC mice compared to controls as well as in wild-type FVB/NRj mice treated with aldosterone (60 µg/kg/day for 21 days) via osmotic minipumps. Thrombin generation in platelet-poor plasma did not differ between MR-EC and controls. In MR-EC mice, aortic EPCR expression was increased. Aldosterone ( $10^{-8}$  M) attenuated thrombin generation at the surface of cultured HAECs and this effect was associated with up-regulation of expression of endothelial cell protein C receptor (EPCR), which promotes formation of activated protein C. Blocking the MR, but not the glucocorticoid receptor, reversed these effects. These findings reveal that MR activation acts on endothelial cells to protect against thrombosis and demonstrate also that MR-mediated EPCR overexpression drives this anti-thrombotic property through enhancing protein C activation.

**Keywords:** mineralocorticoid receptor, endothelial cells, thrombin generation, endothelial protein C receptor, aldosterone

## Introduction

Since the discovery of aldosterone by Simpson *et al.* (1) in 1953 the role of this mineralocorticoid hormone was thought to be limited to salt and water homeostasis in the kidney. The pioneering work of Brilla and Weber in the mid-1990s (2) showed a profibrotic effect of aldosterone in the myocardium and gave new dimensions to this hormone and its receptor, the mineralocorticoid receptor (MR). Significant progress has been made in understanding the pathological situations in which MR antagonism is beneficial but the underlying mechanisms remain unclear. Clinical trials have demonstrated the therapeutic benefit of MR blockade in heart failure (3-5) and aldosterone is often considered as a deleterious hormone in the cardiovascular system (6). In certain situations, however, aldosterone has a paradoxical effect: in diabetic cardiomyopathy, cardiac aldosterone synthesis is beneficial (7); in the vasculature, aldosterone increases either vasodilation (8, 9) or vasoconstriction (10). Therefore the effect of aldosterone may be site-specific and may also depend on the pathological context.

Aldosterone has been proposed to be a prothrombotic factor in animal models (11, 12), through enhancement of platelet activation and impairment of fibrinolysis (13). These effects are partially or totally prevented by MR antagonism (14, 15). In human bone marrow endothelial cells, aldosterone upregulates the endothelial protein C receptor (EPCR) (16). However, no direct measurements of thrombin generation have been reported in this context. Thus, our objective was to determine the role of MR activation/expression restricted to endothelial cells on thrombin generation.

We have therefore developed a strategy combining transgenic mice and cell-based assays to investigate the role of endothelial MR in the putative pro/antithrombotic properties of aldosterone. We first explored EPCR expression and arterial thrombus formation in response to vascular injury in a transgenic mouse strain with conditional overexpression of hMR restricted to the vascular endothelium. To get insights into the underlying mechanisms, we then examined the *in vitro* procoagulant and anticoagulant properties of human aortic endothelial cells (HAECs) in response to aldosterone. The *in vivo* functional consequence of endothelial MR activation is to reduce arterial thrombus formation in mice. Aldosterone decreased thrombin generation at the surface of HAECs via EPCR overexpression and activated protein C (APC) activation.

## **Materials and methods**

**Cell Culture.** Clonetics<sup>®</sup> HAECs from Lonza (Basel, Switzerland) were used at passages 5-7. Cells were grown to sub-confluence in Clonetics<sup>®</sup> EGM<sup>®</sup>-2 endothelial cell growth medium-2 and incubated for 18 h in desteroided serum. Cells were then incubated for 24 h with  $10^{-8}$  M aldosterone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), in the presence or not of  $10^{-6}$  M MR antagonist RU28318 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) or glucocorticoid receptor (GR) antagonist RU486 (Mifepristone, Sigma-Aldrich).

**Mouse strains.** Mice with conditional overexpression of hMR in the vascular endothelium were generated as previously described (10). Monotransgenic tetO-hMR mice and monotransgenic transactivator VE-cadherin-tetOFF mice were mated to obtain double-transgenic mice (MR-EC). Monotransgenic VE-Cadh-tetOFF, tetO-hMR and wild-type FVB/NRj mice were used as controls (CT). Wild-type FVB/NRj mice (WT) were also treated with aldosterone (60  $\mu$ g/kg/day for 21 days) via osmotic minipumps. Three- to 7-month-old male mice were used for experiments. All procedures were conducted in accordance with and approved by the Animal Ethics Committee of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the National Institutes of Health.

**Endothelial cell activation markers.** Circulating and cell-associated von Willebrand factor (vWF) antigen was measured by ELISA vWF (Asserachrom<sup>®</sup>, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France). Each sample was assayed at two dilutions chosen in order to interpolate results using the calibration curve obtained with the human calibrator supplied within the kit (17).

Soluble CD146 was measured using a home-made ELISA. Costar<sup>®</sup> high binding 96-well plates were coated overnight at 4°C with 100  $\mu$ L of the anti-CD146 P1H12 clone at 1  $\mu$ g/mL in carbonate-bicarbonate buffer (0.05 M, pH 9.6). Plates were blocked overnight with 125  $\mu$ L of PBS containing 0.5% gelatin. Samples (100  $\mu$ L) were assayed at 2 dilutions (1:5 and 1:10) in PBS containing 0.05% Tween and incubated for 2 h at room temperature. After subsequent revelation with the anti-CD146 2Q401 monoclonal antibody at 1  $\mu$ g/mL for 1 h and horseradish-conjugated streptavidin at 1:1000 for 15 min at room temperature, color was developed with tetramethylbenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate. Absorbance was measured in a microplate reader at 450 nm.

Cell-associated and secreted EPCR from HAECs was measured by Asserachrom<sup>®</sup> sEPCR (Diagnostica Stago). EPCR in mouse plasma and aorta was measured using a mouse sEPCR ELISA kit (Elabscience<sup>®</sup>, Wuhan, China). Aortic extracts were prepared by 3 freeze-thaw cycles in PBS. A total amount of 2 µg of proteins / well were analyzed in ELISA.

Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) were measured by Quantikine ELISA (R&D Systems, Abingdon, UK). Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) activity was measured by a chromogenic assay (Actichrome<sup>®</sup> TFPI, American Diagnostica GmbH, Stamford, CT). Thrombomodulin (TM) was measured by ELISA (USCN Life Science Inc, Wuhan, China) and ADAM metallopeptidase domain 17 (ADAM17) by ELISA (Cusabio<sup>®</sup> biotech, Wuhan, China). A total amount of 10 µg of aortic proteins / well were analyzed for TM and ADAM17.

**Thrombin generation assay.** Mice were anesthetized with isoflurane. Whole blood was collected by cardiac puncture and mixed with 10% citrate (109 mM) for calibrated automated thrombography (CAT) experiments. Platelet-poor plasma (PPP) was prepared within 2 h following sampling by two successive centrifugations (190g for 10 min and 1750g for 10 min at room temperature), then supernatants were centrifuged at 13000g for 30 min to remove all platelets and cell fragments. PPP and serum were frozen and stored at -80°C until use. CAT was performed for mice PPP (18) without or with rabbit TM (American Diagnostica) at 60 nM, and for human PPP with washed HAEC in a microtiter plate fluorometer (Fluoroskan Ascent, ThermoLabsystems, Helsinki, Finland) using dedicated software (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands) as previously reported (19, 20). Round-bottom 96-well Greiner blue plates were used for mouse PPP and 96-well tissue culture plates for cultured cells (MICROTEST<sup>TM</sup>96) for human PPP with washed HAEC monolayers. Coagulation was triggered by recalcification, in the presence of 6 pM recombinant human tissue factor (TF) (Dade Behring, Marburg, Germany) for mouse PPP. Where indicated, a goat anti-human thrombomodulin (TM) directed against the EGF1-EGF2 domains (American Diagnostica; 30 µg/mL) was added. Some experiments were performed with protein C deficient PPP in the absence or in the presence of home-made purified protein C (17) at a final concentration of 1 U/mL. Thrombin generation curves were recorded in triplicate. The parameters calculated by the software were the lag time, thrombin peak, time-to-peak, velocity, and endogenous thrombin potential (ETP).

**Protein C activation assay.** APC generation on HAECs was measured as described elsewhere (21). Cell monolayers were washed with 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4, and 50  $\mu$ L of protein C (65 nM) were incubated together with 50  $\mu$ L of bovine thrombin (DiaThrombin, DiaMed SA, Cressier s/Morat, Switzerland) (from 0 to 30 nM) on the surface of HAEC at 37°C. After 1 h, thrombin was inhibited with 10  $\mu$ L of 500 nM hirudin and 100  $\mu$ L of each sample was transferred to wells of 96-well Polysorp plates containing 50  $\mu$ L of S2366 substrate (0.4 mM). APC activity was determined by measuring the rate of hydrolysis of S2366 at 405 nm. Dilution of known concentrations of purified APC (22) (0 to 5 nM) were used for preparation of the calibration curve.

**FeCl<sub>3</sub>-induced arterial thrombosis.** Mice were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg, ip) and the carotid arteries were exposed using blunt dissection. An ultrasound transit-time flow probe (0.5 PSB Nanoprobe, Transonic, Ithaca, NY) was placed on the left carotid artery to monitor blood flow. Data were recorded, stored, and analyzed using a Data Translation analog-to-digital converter and IOX software (EMKA Technologies, Paris, France). Thrombus formation was induced by applying two pieces of filter paper, soaked in a 3% aqueous FeCl<sub>3</sub> solution, to the outside of the carotid artery. After 3 min of exposure, the filter papers were removed and the vessel was washed with physiological saline. Carotid blood flow was monitored for 5 min before ferric chloride application to measure the basal level, and continuously after FeCl<sub>3</sub> application; flow rates were illustrated prior to (time 0) and at the end of FeCl<sub>3</sub> application. Total carotid occlusion was checked visually after each experiment.

**Isolation of RNA and gene expression.** Total RNA was isolated from HAECs using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands). First-strand cDNA was synthesised according to the manufacturer's instructions (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Quantitative real-time PCR analysis was then performed with SYBR green PCR technology (Bio-Rad, Hercules, CA) using the following conditions: 10 seconds at 95°C; 45 seconds at the annealing temperature (T<sub>a</sub>); 60 seconds at 72°C, repeated for 40 cycles. PCR primers and T<sub>a</sub> for genes of interest are listed in Supplemental Table SI. Results from at least three independent RT-PCR analyses were expressed relative to glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression.

**Western Blot Analysis.** Protein lysates were analyzed by standard SDS-PAGE techniques as previously described (23). Membranes were incubated with primary antibodies at 4°C overnight according to the following conditions: EPCR (1:1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), TM (1:1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology) and TFPI (1:1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology). Equal protein loading was ensured by probing with 1:2000  $\alpha$ -tubulin antibody (Sigma-Aldrich). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies specific for the host species of the primary antibodies were applied to the membranes for 1 h at 20°C. Reactions were visualised using the ECL Western Blot Detection Kit (Bio-Rad). Densitometry was measured in pixel intensity by Multi Gauge V3.0.

**Immunostaining.** Immunostaining was performed as previously described (24). HAECs and cryosections of mouse aortas were fixed with paraformaldehyde (4% weight/vol in Tris buffered saline-TBS) for 10 min, blocked with 5% BSA in TBS for 30 min. HAECs were incubated for 1 h at room temperature with an anti-EPCR antibody (1:50, mouse monoclonal, R&D Systems) and a rabbit polyclonal antibody against TM (1:50, Santa Cruz Biotechnology). The DyLight488-conjugated anti-mouse antibody (1:100, Abcam) and DyLight549-conjugated anti-rabbit antibody (1:100, Abcam) were then incubated with the cells for 1 h at room temperature. Mouse aortas were stained with a rat monoclonal antibody against EPCR (1:100, EBioscience San Diego CA) and a mouse monoclonal antibody against smooth muscle actin (1:400, Sigma) for 1 h at room temperature, then biotinylated-conjugated anti-rat from goat (1:100, Santa Cruz Biotechnology) or Alexa488-conjugated anti-mouse (1:100, Molecular Probes) secondary antibody was applied for 60 min followed by Cy3-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch) for 30 min. Nuclei were counterstained with DAPI (Sigma). Cells and cryosections were then observed by fluorescence confocal microscopy (LEICA TCS SP5, Wetzlar, Germany).

**Statistical analysis.** Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using the Student's t-test for unpaired or paired data as appropriate.

## **Results**

### **Aldosterone infusion and endothelial MR overexpression increases the time to vessel occlusion after FeCl<sub>3</sub> injury**

We first explored whether aldosterone produces a net prothrombotic or antithrombotic effect by challenging the wild-type FVB/NRj mice with aldosterone for 3 weeks before assessing thrombus formation in a thrombosis model based on external application of FeCl<sub>3</sub> to the carotid artery. As normal vascular endothelium is known to act as an anticoagulant blood container, an antithrombotic effect of aldosterone signaling on endothelial cells could be hypothesized. To assess the specific role of MR in the endothelium in absence of secondary effects related to global aldosterone challenge, we also examined whether targeted increase in MR expression in endothelial cells only affects thrombosis in MR-EC mice. Before FeCl<sub>3</sub> application, blood flow was similar between MR-EC or aldosterone-treated WT and their respective controls. After FeCl<sub>3</sub> application, blood flow decreased more slowly in aldosterone-treated WT and MR-EC compared with respective controls (**Fig. 1A, B**). Aldosterone-treated WT and MR-EC exhibited successive increases and decreases in blood flow, suggesting the presence of unstable clots before the establishment of a stable one. Occlusion time was longer in aldosterone-treated WT and MR-EC (by a factor of 1.5 and 1.7 respectively) than in controls (**Fig. 1C**), supporting an antithrombotic effect of MR on endothelium. In the absence of the APC pathway and endothelial cell surfaces, thrombin generation in PPP did not differ between MR-EC and CT groups (**Fig. 1D**) and between aldosterone-treated and untreated mice (not shown). The addition of soluble TM to plasma improves the physiologic relevance of coagulation assays by allowing the protein C system to exert its crucial role in the downregulation of thrombin formation. Added TM diminished ETP, thrombin peak and velocity of thrombin conversion similarly in the two groups of mice (**Fig. 1D, E and Table 1**), thus suggesting that the effect of MR required endothelial cellular surfaces.

#### ***In vivo* endothelial MR overexpression increases EPCR expression in mouse aorta**

To test an involvement of soluble endothelial proteins, we evaluated the effect of endothelial MR activation on soluble markers of endothelial function. Plasma vWF was increased in MR-EC compared to CT (**Table 2**). No difference between MR-EC and CT was found either for the other soluble markers of endothelial function, sCD146 (a marker of endothelial junction), sICAM and sVCAM (inflammatory markers), sTM and TFPI (anticoagulant molecules), or for the soluble form of EPCR. Unlike the soluble form, membrane-bound EPCR favors protein C activation mainly in the macrovasculature. We therefore investigated EPCR expression in mouse aorta. EPCR protein level was increased in the aorta of MR-EC compared to CT without changes in ADAM17 (**Table 2**), a metalloproteinase responsible for

EPCR ectodomain shedding. Expression of TM, the other component of the APC pathway on the endothelial cell surface, was unchanged. Confocal microscopy revealed higher levels of EPCR expression in endothelial cells but not in smooth muscle cells in MR-EC than in CT (**Fig. 1F**). These results suggest that increase EPCR expression may be involved in the antithrombotic effect of MR activation.

### **Aldosterone decreases thrombin generation on human aortic endothelial cells**

To explore the effects of MR activation on thrombin generation at the surface of endothelial cells, HAECs were stimulated for 24 h with  $10^{-8}$  M aldosterone. Aldosterone increased vWF mRNA expression 1.4 fold ( $n = 6$ ;  $P=0.04$ ) as well as cell-associated vWF (ng/mg:  $641 \pm 38$  versus  $556 \pm 25$ ;  $n = 16$ ;  $P=0.04$ ) and vWF released into the cell supernatant (ng/mL:  $132 \pm 4$  versus  $116 \pm 9$ ;  $n = 16$ ;  $P=0.04$ ). Thrombin generation was significantly reduced at the surface of aldosterone-treated HAECs (**Fig. 2A, B**), with changes in all kinetic parameters: a small but statistically significant delay of the lag time and the time-to-peak, an obvious decrease in the peak size and a more modest reduction in the velocity of thrombin formation (**Table 3**). To assess the relative involvement of the MR and the GR in these effects, HAECs were incubated with aldosterone along with the MR antagonist RU28318 or the GR antagonist RU486. All aldosterone effects were prevented by RU28318 but not by RU486 whereas the antagonists added to control cells failed to modify the thrombin generation pattern (**Fig. 2A, B**). These results support an MR-dependent limitation of thrombin generation and suggest that activation of the MR on the endothelium may enhance its thromboresistance.

### **Impaired thrombin generation in response to MR activation is driven by EPCR overexpression**

To provide mechanistic insights into the inhibitory effects of MR activation on thrombin generation, we examined the effects of aldosterone on the expression of EPCR, TM and TFPI in HAECs. EPCR gene expression was increased in response to aldosterone (**Fig. 3A**). This increase was specifically dependent on MR activation, because it was abrogated only by RU28318 and not by RU486. At the protein level, both cell-associated and secreted EPCR were significantly elevated (**Fig. 3B** and Supplemental Fig. I). These changes were reversed by the MR antagonist, confirming the role of MR. By contrast, TM and TFPI gene and protein expressions were unchanged in response to aldosterone (**Fig. 3A** and Supplemental Fig. I). Confocal analysis revealed that the MR-dependent increase in EPCR was not associated with any increase in colocalization of EPCR and TM (**Fig. 3C**). To evaluate a possible effect of



cell-bound EPCR overexpression on TM-mediated protein C activation and subsequent inhibition of thrombin generation, experiments were performed in presence of an anti-TM antibody. Inhibition of protein C activation by the anti-TM antibody resulted in an enhancement of both the thrombin peak and ETP, which was not impaired by aldosterone (**Fig. 3D**). Similar results were obtained with protein C-deficient PPP (**Fig. 3E**) and aldosterone did not modify the pattern of thrombin generation; the addition of purified protein C to this PPP totally restored the effect of aldosterone, indicating that the ability of aldosterone to reduce thrombin formation is mainly attributable to enhanced protein C activation. This hypothesis was confirmed in a purified system where washed HAECs were incubated with purified protein C and increasing concentrations of thrombin. Aldosterone enhanced APC generation on these cells in a thrombin dose-dependent manner (**Fig. 3F**). This effect was prevented by RU28318, indicating the causal role of MR.

## **Discussion**

We show here that MR activation attenuates thrombus formation in the mouse carotid artery and thrombin generation at the surface of human aortic endothelial cells. The mechanism involves upregulation of EPCR gene and protein expression and thereby enhancement of protein C activation.

Endothelial activation by aldosterone has been previously reported in HAECs: aldosterone incubation for 1 h stimulated endothelial exocytosis of Weibel-Palade bodies, externalizing P-selectin and releasing vWF into the culture medium (25). We confirmed this result in HAECs after 24 h aldosterone stimulation. Our results showed that MR, as an aldosterone-activated transcription factor, upregulates EPCR gene expression with subsequent attenuation of thrombin generation. EPCR has long been known to play a central role in orchestrating the functions of the protein C pathway (26, 27). EPCR downregulates blood coagulation on the surface of large vessels by concentrating protein C on the endothelium and accelerating its activation by the thrombin/TM complex. APC combined with cell-expressed TFPI synergistically inhibits thrombin generation on vascular cells (28). The absence of changes in TM and TFPI expression excludes the possibility that these two other endothelial anticoagulant molecules are involved in downregulating thrombin generation on HAECs. We have used HAECs as a cellular model for activation by aldosterone since the results from the two whole animal models used were the same. Furthermore, in culture conditions the HAECs

are stable (as measured by vWF and CD31 expression) whereas endothelial cells with increased MR expression are not reliably stable.

Therefore, to test the impact of MR-dependent EPCR stimulation on thrombin generation *in vivo*, we took advantage of the fact that MR overexpression in mouse vascular endothelium is not accompanied by stimulation of the renin-angiotensin system. These mice exhibited a mild increase in blood pressure ( $113 \pm 4$  versus  $125 \pm 5$  mmHg) mainly due to increased sensitivity to vasoactive agents. We cannot therefore exclude that endothelial activation in our study may result in part from this blood pressure elevation (10). Among endothelial markers, only plasma levels of vWF are elevated in MR-EC mice relative to control animals and we previously reported no decrease in flow-mediated dilation. Moreover, several genes involved in oxidative stress in this model, suggesting that endothelial activation is a direct aldosterone/MR-mediated effect, as previously demonstrated in HAECs (25). Together, these findings might be taken as evidence that modest endothelial activation, rather than endothelial damage, occurs in MR-EC mice. Such endothelial activation may be driven by MR activation with subsequent modulation of vascular gene expression (29).

MR overexpression in the vascular endothelium *in vivo* attenuated thrombus formation in a mouse FeCl<sub>3</sub> carotid injury model. This argues for a stimulation of the antithrombotic rather than the prothrombotic role of the activated endothelium. The demonstration that aldosterone reduced thrombin generation on HAECs via EPCR upregulation points to an *in vivo* mechanism involving an MR-mediated increase in endothelial EPCR expression. The finding that plasma levels of EPCR were not elevated in MR-EC mice rules out any involvement of this soluble form in the regulation of thrombin generation and is consistent with the absence of change in ADAM17 which is responsible for EPCR shedding (30). The increase in membrane EPCR in MR-EC aorta supports this hypothesis. This assumption is also corroborated by the observation that decreased thrombin generation does not occur in MR-EC PPP, even in the presence of TM but where membrane EPCR is not operating. Although previous findings suggested that FeCl<sub>3</sub> application leads to endothelial denudation, it has been recently demonstrated that this model does not include endothelial damage within the frame of thrombosis (31), supporting the idea that MR activation and upregulation of EPCR contribute to the observed phenotype in our study. This beneficial anticoagulant role of EPCR is consistent with previous observations: (i) MR-mediated EPCR induction increased the prolongation of coagulation time by APC (16); (ii) mice overexpressing EPCR on endothelial cells displayed increased circulating APC levels in response to thrombin infusion and

decreased thrombin/anti-thrombin complex formation upon challenge with FXa and phospholipids (32); (iii) membrane EPCR ligand binding site occupancy by antibodies promoted thrombus formation in a mouse FeCl<sub>3</sub> carotid injury model (33).

The finding that MR activation in the endothelium reduces thrombus formation in our mouse model may appear somewhat in opposition to existing literature since deleterious effects of MR activation on primary hemostasis, blood coagulation and fibrinolysis have been reported to be associated with increased oxidative stress, decreased NO generation and prevented by eplerenone administration (11-13, 34). Our interpretation is that the net effect of aldosterone signaling on thrombosis takes into account all vascular, blood cell types and factors. Our finding that aldosterone delayed FeCl<sub>3</sub>-induced thrombosis, as in MR-EC mice, is in favor of an overall antithrombotic effect of aldosterone in the presence of an intact endothelium. In our study, the fact that we administered a low level of aldosterone alone, compared with the work of Bodary et al. which used a much higher dose, may explain the opposite finding (i.e. accelerated thrombosis) in this last study.

However, the resulting effect of aldosterone/MR in thrombosis may be dependent on the cellular context and the pathological setting. Indeed while aldosterone/MR is clearly deleterious for arrhythmia, myocardial infarction and heart failure, cardiac aldosterone prevents harmful effects of diabetes in the mouse heart by preserving capillary density (7). In the vasculature, aldosterone may promote vasodilation in situations with low levels of oxidative stress, while at higher levels (high salt intake, vascular injury, high oxygen tension, inflammation) aldosterone is associated with vasoconstriction (8, 29). Discrepant results from clinical studies show that inhibition of MR improves endothelial vasodilator dysfunction and NO bioavailability in patients with heart failure but worsens endothelial function in type 2 diabetic patients (8). All these data suggest that vascular health status, extent, duration and the combination of endothelial dysfunction/damage and vascular oxidative stress are critical contributors to the net effect of MR activation on vascular function. A detrimental prothrombotic role of MR activation in disease is attractive, based on the concept that a stressed/damaged endothelium shifts from a quiescent healthy antithrombotic state to a pro-vasoconstrictive, pro-inflammatory and prothrombotic phenotype in response to specific challenges (35, 36).

The anti-thrombotic property of MR activation may have clinical implications in oral contraceptive administration. Recently, drospirenone-containing oral contraceptives were reported to be unexpectedly associated with an increased risk of deep vein thrombosis and

pulmonary embolism relative to other combined oral contraceptives (37-39). Unlike the other contraceptives, drospirenone is also a potent MR antagonist (40). Further studies are thus required to test the effect of drospirenone on hemostatic properties in comparison to other third generation oral contraceptives and to evaluate the implication of its MR antagonist property.

In conclusion, our results demonstrate that MR activation in the endothelium protects against thrombosis through interactions with the APC pathway supported by MR-mediated EPCR overexpression. This protective effect could be lost in the presence of endothelial damage, which is consistent with the beneficial effect of MR antagonists in cardiovascular diseases.

### **Acknowledgments**

The authors thank Christos Chatzantoniou and Sandrine Placier for their assistance in setting up the arterial thrombosis model. We are grateful to Sebastien Hupont (FR 3209) for his participation. We thank Mary Osborne-Pellegrin for helpful discussion and comments on the manuscript.

This study was supported by the ANR BLANC program NT09\_450866. J.L. is supported by the Region Lorraine and the Communauté Urbaine du Grand Nancy.

### **References**

1. Simpson, S. A., Tait, J. F., Wettstein, A., Neher, R., Von Euw, J., and Reichstein, T. (1953) [Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism]. *Experientia* **9**, 333-335
2. Brilla, C. G., Pick, R., Tan, L. B., Janicki, J. S., and Weber, K. T. (1990) Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* **67**, 1355-1364
3. Messaoudi, S., Azibani, F., Delcayre, C., and Jaisser, F. (2012) Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Mol Cell Endocrinol* **350**, 266-272
4. Pitt, B., Remme, W., Zannad, F., Neaton, J., Martinez, F., Roniker, B., Bittman, R., Hurley, S., Kleiman, J., and Gatlin, M. (2003) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* **348**, 1309-1321

5. Zannad, F., McMurray, J. J., Krum, H., van Veldhuisen, D. J., Swedberg, K., Shi, H., Vincent, J., Pocock, S. J., and Pitt, B. (2011) Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* **364**, 11-21
6. Funder, J. W. (2004) Is aldosterone bad for the heart? *Trends Endocrinol Metab* **15**, 139-142
7. Messaoudi, S., Milliez, P., Samuel, J. L., and Delcayre, C. (2009) Cardiac aldosterone overexpression prevents harmful effects of diabetes in the mouse heart by preserving capillary density. *FASEB J* **23**, 2176-2185
8. Skott, O., Uhrenholt, T. R., Schjerning, J., Hansen, P. B., Rasmussen, L. E., and Jensen, B. L. (2006) Rapid actions of aldosterone in vascular health and disease--friend or foe? *Pharmacol Ther* **111**, 495-507
9. Zhao, M., Celerier, I., Bousquet, E., Jeanny, J. C., Jonet, L., Savoldelli, M., Offret, O., Curan, A., Farman, N., Jaisser, F., and Behar-Cohen, F. (2012) Mineralocorticoid receptor is involved in rat and human ocular chorioretinopathy. *J Clin Invest* **122**, 2672-2679
10. Nguyen Dinh Cat, A., Griol-Charhbil, V., Loufrani, L., Labat, C., Benjamin, L., Farman, N., Lacolley, P., Henrion, D., and Jaisser, F. (2010) The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J* **24**, 2454-2463
11. Bodary, P. F., Sambaziotis, C., Wickenheiser, K. J., Rajagopalan, S., Pitt, B., and Eitzman, D. T. (2006) Aldosterone promotes thrombosis formation after arterial injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 233
12. Stankiewicz, A., Gromotowicz, A., Szemraj, J., Wojewodzka-Zelezniakowicz, M., Skrzypkowski, P., and Chabielska, E. (2007) Acute aldosterone infusion enhances thrombosis development in normotensive rats. *Thromb Haemost* **98**, 697-699
13. Gromotowicz, A., Szemraj, J., Stankiewicz, A., Zakrzaska, A., Mantur, M., Jaroszewicz, E., Rogowski, F., and Chabielska, E. (2011) Study of the mechanisms of aldosterone prothrombotic effect in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*
14. Schafer, A., Fraccarollo, D., Hildemann, S., Christ, M., Eigenthaler, M., Kobsar, A., Walter, U., and Bauersachs, J. (2003) Inhibition of platelet activation in congestive heart failure by aldosterone receptor antagonism and ACE inhibition. *Thromb Haemost* **89**, 1024-1030

15. Schafer, A., Vogt, C., Fraccarollo, D., Widder, J., Flierl, U., Hildemann, S. K., Ertl, G., and Bauersachs, J. (2010) Eplerenone improves vascular function and reduces platelet activation in diabetic rats. *J Physiol Pharmacol* **61**, 45-52
16. Ducros, E., Berthaut, A., Mirshahi, S. S., Faussat, A. M., Soria, J., Agarwal, M. K., and Mirshahi, M. (2008) Aldosterone modifies hemostasis via upregulation of the protein-C receptor in human vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* **373**, 192-196
17. Regnault, V., Rivat, C., Pfister, M., and Stoltz, J. F. (1991) Monoclonal antibodies against human plasma protein C and their uses for immunoaffinity chromatography. *Thromb Res* **63**, 629-640
18. Tchaikovski, S. N., BJ, V. A. N. V., Rosing, J., and Tans, G. (2007) Development of a calibrated automated thrombography based thrombin generation test in mouse plasma. *J Thromb Haemost* **5**, 2079-2086
19. Hemker, H. C., Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., de Smedt, E., Wagenvoord, R., Lecompte, T., and Beguin, S. (2003) Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* **33**, 4-15
20. Regnault, V., Hemker, H. C., Wahl, D., and Lecompte, T. (2004) Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res* **114**, 539-545
21. Hackeng, T. M., Tans, G., Koppelman, S. J., de Groot, P. G., Rosing, J., and Bouma, B. N. (1996) Protein C activation on endothelial cells by prothrombin activation products generated in situ: meizothrombin is a better protein C activator than alpha-thrombin. *Biochem J* **319** ( Pt 2), 399-405
22. Regnault, V., de Maistre, E., Geschier, C., Briquel, M. E., André, E., Stoltz, J. F., and Lecompte, T. (1995) A new fast one-step immunopreparation for activated protein C. *Thromb Haemost* **73**, 1365
23. Mao, X., Said, R., Louis, H., Max, J. P., Bourhim, M., Challande, P., Wahl, D., Li, Z., Regnault, V., and Lacolley, P. (2012) Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin alphavbeta3 pathway. *Cardiovasc Res* **96**, 513-523
24. Parlakian, A., Gomaa, I., Solly, S., Arandel, L., Mahale, A., Born, G., Marazzi, G., and Sassoon, D. (2010) Skeletal muscle phenotypically converts and selectively inhibits metastatic cells in mice. *PLoS One* **5**, e9299

25. Jeong, Y., Chaupin, D. F., Matsushita, K., Yamakuchi, M., Cameron, S. J., Morrell, C. N., and Lowenstein, C. J. (2009) Aldosterone activates endothelial exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3782-3787
26. Esmon, C. T. (2004) Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor. *Crit Care Med* **32**, S298-301
27. Weiler, H. (2011) Multiple receptor-mediated functions of activated protein C. *Hamostaseologie* **31**, 185-195
28. van 't Veer, C., Golden, N. J., Kalafatis, M., and Mann, K. G. (1997) Inhibitory mechanism of the protein C pathway on tissue factor-induced thrombin generation. Synergistic effect in combination with tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* **272**, 7983-7994
29. McCurley, A., and Jaffe, I. Z. (2012) Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol Cell Endocrinol* **350**, 256-265
30. Qu, D., Wang, Y., Esmon, N. L., and Esmon, C. T. (2007) Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost* **5**, 395-402
31. Barr, J. D., Chauhan, A. K., Schaeffer, G. V., Hansen, J. K., and Motto, D. G. (2013) Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model. *Blood* **121**, 3733-3741
32. Li, W., Zheng, X., Gu, J., Hunter, J., Ferrell, G. L., Lupu, F., Esmon, N. L., and Esmon, C. T. (2005) Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin. *J Thromb Haemost* **3**, 1351-1359
33. Centelles, M. N., Puy, C., Lopez-Sagaseta, J., Fukudome, K., Montes, R., and Hermida, J. (2010) Blocking endothelial protein C receptor (EPCR) accelerates thrombus development in vivo. *Thromb Haemost* **103**, 1239-1244
34. Chander, P. N., Rocha, R., Ranaudo, J., Singh, G., Zuckerman, A., and Stier, C. T., Jr. (2003) Aldosterone plays a pivotal role in the pathogenesis of thrombotic microangiopathy in SHRSP. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1990-1997
35. Burger, D., and Touyz, R. M. (2012) Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens* **6**, 85-99
36. Deanfield, J. E., Halcox, J. P., and Rabelink, T. J. (2007) Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* **115**, 1285-1295

37. Lidegaard, O., Lokkegaard, E., Jensen, A., Skovlund, C. W., and Keiding, N. (2012) Thrombotic stroke and myocardial infarction with hormonal contraception. *N Engl J Med* **366**, 2257-2266
38. Lidegaard, O., Nielsen, L. H., Skovlund, C. W., Skjeldestad, F. E., and Lokkegaard, E. (2011) Risk of venous thromboembolism from use of oral contraceptives containing different progestogens and oestrogen doses: Danish cohort study, 2001-9. *BMJ* **343**, d6423
39. Wu, C., Grandi, S., Filion, K., Abenhaim, H., Joseph, L., and Eisenberg, M. (2013) Drospirenone-containing oral contraceptive pills and the risk of venous and arterial thrombosis: a systematic review. *BJOG*
40. Kolkhof, P., and Borden, S. A. (2012) Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics. *Mol Cell Endocrinol* **350**, 310-317



**Table 1. Thrombin generation parameters in mouse platelet-poor plasma**

	no TM		TM 60 nM		no TM		TM 60 nM	
	CT	MR-EC	CT	MR-EC	WT	Aldo-WT	WT	Aldo-WT
	n = 15	n = 10	n = 9	n = 9	n = 7	n = 8	n = 5	n = 5
<b>ETP, nM×min</b>	302 ± 11	304 ± 6	236 ± 26	235 ± 16	253 ± 8	255 ± 17	153 ± 13	177 ± 32
<b>Lag time, min</b>	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2
<b>Peak, nM</b>	86 ± 4	87 ± 3	63 ± 6	60 ± 4	86 ± 5	85 ± 6	33 ± 5	38 ± 8
<b>Time-to-peak, min</b>	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.1	4.4 ± 0.4	4.2 ± 0.3	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.2	5.3 ± 0.5	5.2 ± 0.8
<b>Velocity, nM/min</b>	48 ± 4	44 ± 3	31 ± 4	30 ± 3	50 ± 4	50 ± 4	12 ± 3	15 ± 4
<b>TMs<sub>r</sub></b>			0.75 ± 0.04	0.77 ± 0.05			0.60 ± 0.08	0.74 ± 0.10

Results are means ± SEM. Thrombin generation was determined in PPP in the absence or presence of 60 nM rabbit thrombomodulin (TM). ETP indicates the endogenous thrombin potential; TMs<sub>r</sub>, TM sensitivity ratio (ETP in the presence of TM / ETP in the absence of TM).

**Table 2. Endothelial markers in MR-EC and control mice**

	<b>CT</b>	<b>MR-EC</b>
<i>Plasma levels</i>	<i>n = 12</i>	<i>n = 14</i>
<b>vWF, ng/mL</b>	658 ± 101	1006 ± 115 *
<b>sCD146, OD (450nm)</b>	0.66 ± 0.04	0.69 ± 0.07
<b>sICAM-1, ng/mL</b>	4.2 ± 0.2	4.4 ± 0.4
<b>sVCAM-1, ng/mL</b>	7.9 ± 0.4	8.5 ± 0.7
<b>TFPI, U/mL</b>	3.5 ± 0.3	3.2 ± 0.4
<b>sTM, ng/mL</b>	1.24 ± 0.10	1.06 ± 0.08
<b>sEPCR, ng/mL</b>	22 ± 5	17 ± 3
<i>Aorta levels</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 7</i>
<b>TM, ng/mL</b>	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.4
<b>EPCR, ng/mL</b>	13.5 ± 0.4	15.7 ± 0.8 *
<b>ADAM17, ng/mL</b>	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1

Data are means ± SEM. vWF, von Willebrand factor; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; TM, thrombomodulin; EPCR, endothelial protein C receptor; ADAM17, ADAM metalloproteinase domain 17; \*  $P < 0.05$  versus CT.

**Table 3. Thrombin generation parameters at the surface of human aortic endothelial cells**

	<b>Control</b>	<b>Aldosterone</b>	<b>Aldosterone + RU28318</b>	<b>Aldosterone + RU486</b>	<b>Control + RU28318</b>	<b>Control + RU486</b>
<b>ETP, nM×min</b>	785 ± 17	661 ± 17 *	770 ± 19	688 ± 35 *	778 ± 32	763 ± 33
<b>Lag time, min</b>	10.6 ± 0.3	11.2 ± 0.3 *	10.8 ± 0.2	11.3 ± 0.3 *	10.8 ± 0.4	10.6 ± 0.5
<b>Peak, nM</b>	59 ± 2	51 ± 1 *	60 ± 2	54 ± 1 *	61 ± 2	58 ± 2
<b>Time-to-peak, min</b>	17.1 ± 0.3	17.9 ± 0.3 *	17.4 ± 0.2	18.1 ± 0.5 *	17.3 ± 0.5	16.8 ± 0.6
<b>Velocity, nM/min</b>	9.4 ± 0.3	8.6 ± 0.3 *	9.2 ± 0.5	8.7 ± 0.3 *	9.9 ± 0.6	9.0 ± 0.2

Results are means ± SEM of 9 to 18 experiments. ETP indicates the endogenous thrombin potential. \*  $P < 0.05$  versus untreated cells (control).

## Figure legends

**Figure 1. Determination of thrombus formation (blood flow and occlusion time), plasma thrombin generation and membrane-bound EPCR expression in aldosterone-treated wild-type and/or MR-EC mice.** **A)** Tracings representing flow rate in the carotid artery after exposure to 3% FeCl<sub>3</sub> for 3 min in one typical aldosterone-treated wild-type FVB/NRj mouse (Aldo-WT, dark gray) and one typical untreated wild-type FVB/NRj mouse (WT, gray). Mice were treated with aldosterone (60 µg/kg/day for 21 days) via osmotic minipumps before assessing FeCl<sub>3</sub>-induced thrombosis. **B)** Tracings representing flow rate in the carotid artery after exposure to 3% FeCl<sub>3</sub> for 3 min in one typical MR-EC mouse (black) and one typical control mouse (CT, gray) mice. **C)** Vascular occlusion times in Aldo-WT, WT, MR-EC and CT mice. Results are means ± SEM (n= 4-10). \* P < 0.05 versus respective controls. **D)** Representative thrombin generation curves in platelet poor plasma triggered with 1 pM of tissue factor in MR-EC (black) or CT (gray) in absence (left) or in presence (right) of 60 nM thrombomodulin (TM). **E)** Endogenous thrombin potential (ETP) values were significantly lower in CT and MR-EC in presence of TM. Results are means ± SEM of 9 experiments. \* P < 0.05 versus same group in the absence of TM. **F)** Confocal micrographs of representative cross sections of thoracic aortas. Nuclei were visualized by DAPI staining, EPCR is identified by red immunostaining and smooth muscle actin by green immunostaining. Scale bar = 20 µm.

**Figure 2. MR mediates the aldosterone-induced decrease in thrombin formation in cultured human aortic endothelial cells (HAECs).** Pooled normal human platelet-poor plasma was added to confluent cell monolayers incubated for 24 h with 10<sup>-8</sup> M aldosterone, 10<sup>-8</sup> M aldosterone plus 10<sup>-6</sup> M RU28318, 10<sup>-8</sup> M aldosterone plus 10<sup>-6</sup> M RU486, 10<sup>-6</sup> M RU28318 or 10<sup>-6</sup> M RU486 alone. Thrombin generation was triggered by recalcification with 16.7 mM CaCl<sub>2</sub> and monitored with the calibrated automated thrombogram (CAT) assay. **A)** Representative thrombin generation curves. **B)** Endogenous thrombin potential (ETP) values were significantly lower in aldosterone- and aldosterone plus RU 486-treated cells than in untreated cells. Results are means ± SEM of 9 independent experiments. \* P < 0.05 versus control.

**Figure 3. MR-mediated induction of endothelial protein C receptor (EPCR) upregulates activated protein C (APC) generation on aldosterone-treated human aortic endothelial cells**

(**HAECs**). Cell monolayers were stimulated for 24 h with  $10^{-8}$  M aldosterone,  $10^{-8}$  M aldosterone plus  $10^{-6}$  M RU28318 or  $10^{-8}$  M aldosterone plus  $10^{-6}$  M RU486. **A**) Relative fold change in *PROCR*, *THBD* and *TFPI* mRNA expression. **B**) Protein levels of EPCR in cell supernatants and cell-associated proteins. Results are means  $\pm$  SEM of 3 experiments performed in triplicate. **C**) Characterization of EPCR and thrombomodulin (TM) expression using confocal analysis. Dual immunofluorescence was performed using antibodies specific for EPCR (green) and TM (red). Scale bar = 20  $\mu$ m. **D**) Typical thrombin generation curves obtained in the presence of an anti-TM antibody (30  $\mu$ g/mL) in platelet-poor plasma (PPP) added to washed untreated (control) and aldosterone-treated (aldo) HAECs. Thrombin generation was triggered by recalcification with 16.7 mM  $\text{CaCl}_2$  and monitored with the calibrated automated thrombogram assay. One representative experiment out of 3 is shown. **E**) Representative tracings of 3 experiments performed with protein C-deficient PPP (def PC) added to control and aldosterone-treated HAECs in the presence or not of purified protein C (PC) at a final concentration of 1 U/mL. **F**) PC activation at the surface of control, aldosterone-treated or aldosterone plus RU28318-treated HAECs was evaluated with purified PC and thrombin. APC is expressed as the ratio of values with aldosterone-treated cells to those with control cells (means  $\pm$  SEM of 9 to 12 experiments). \*  $P < 0.05$  versus control.

**Figure 1**

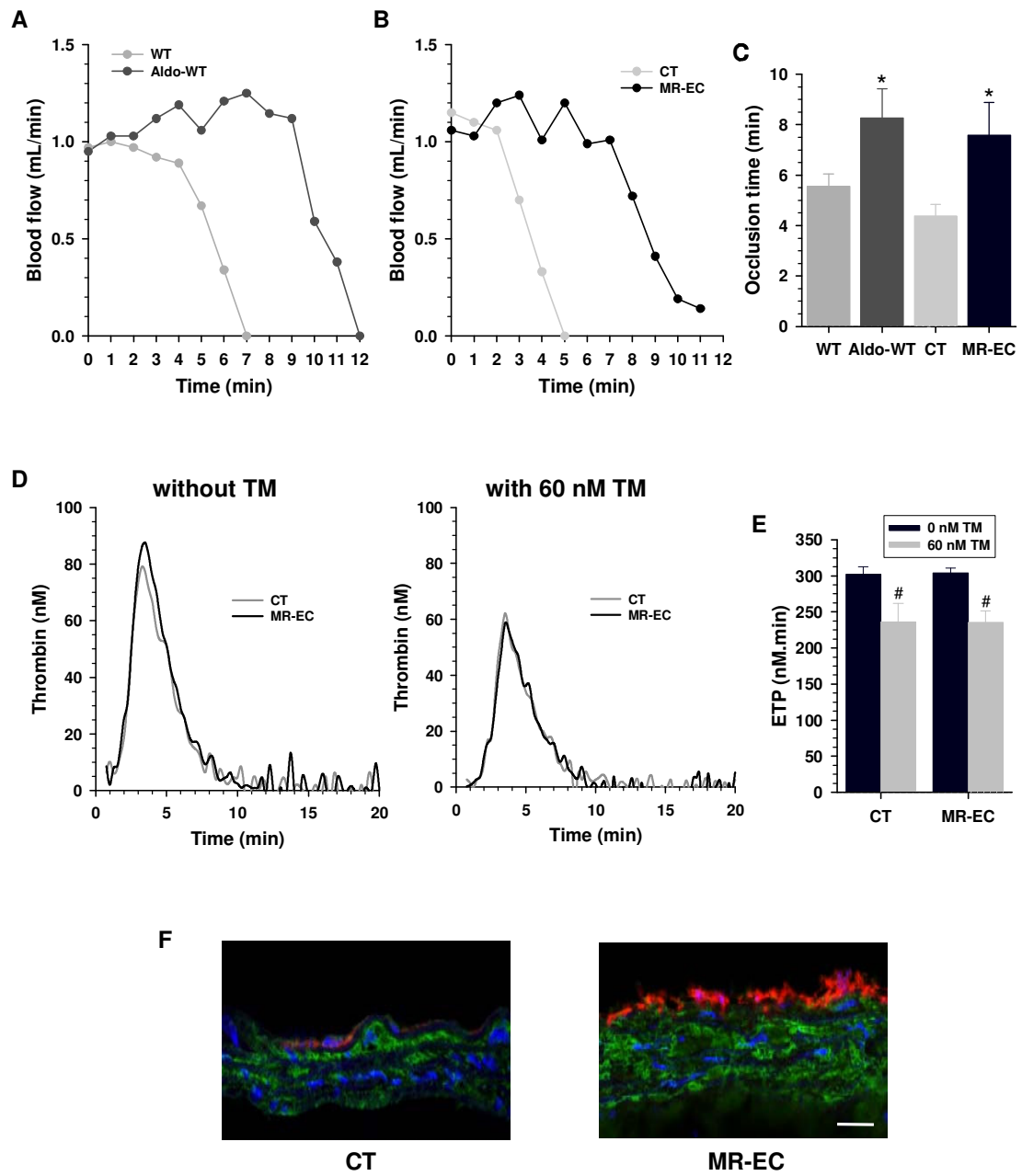
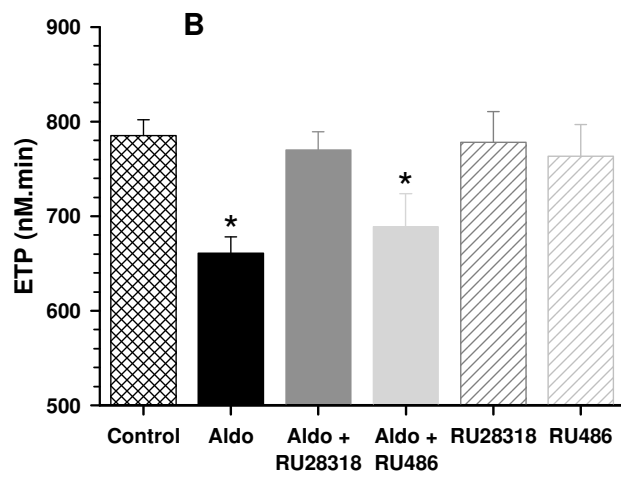
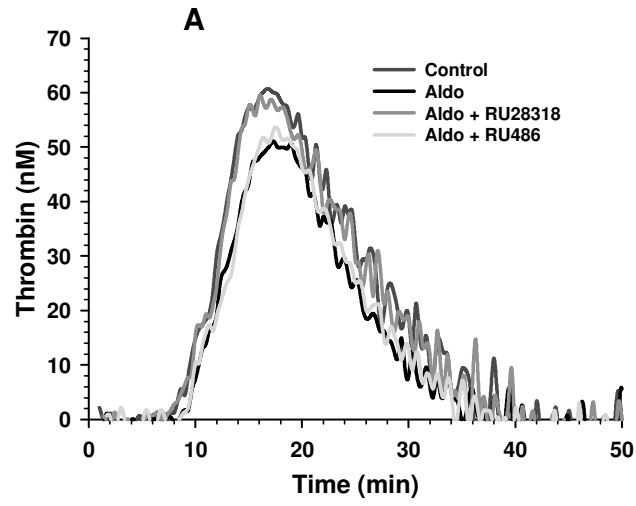
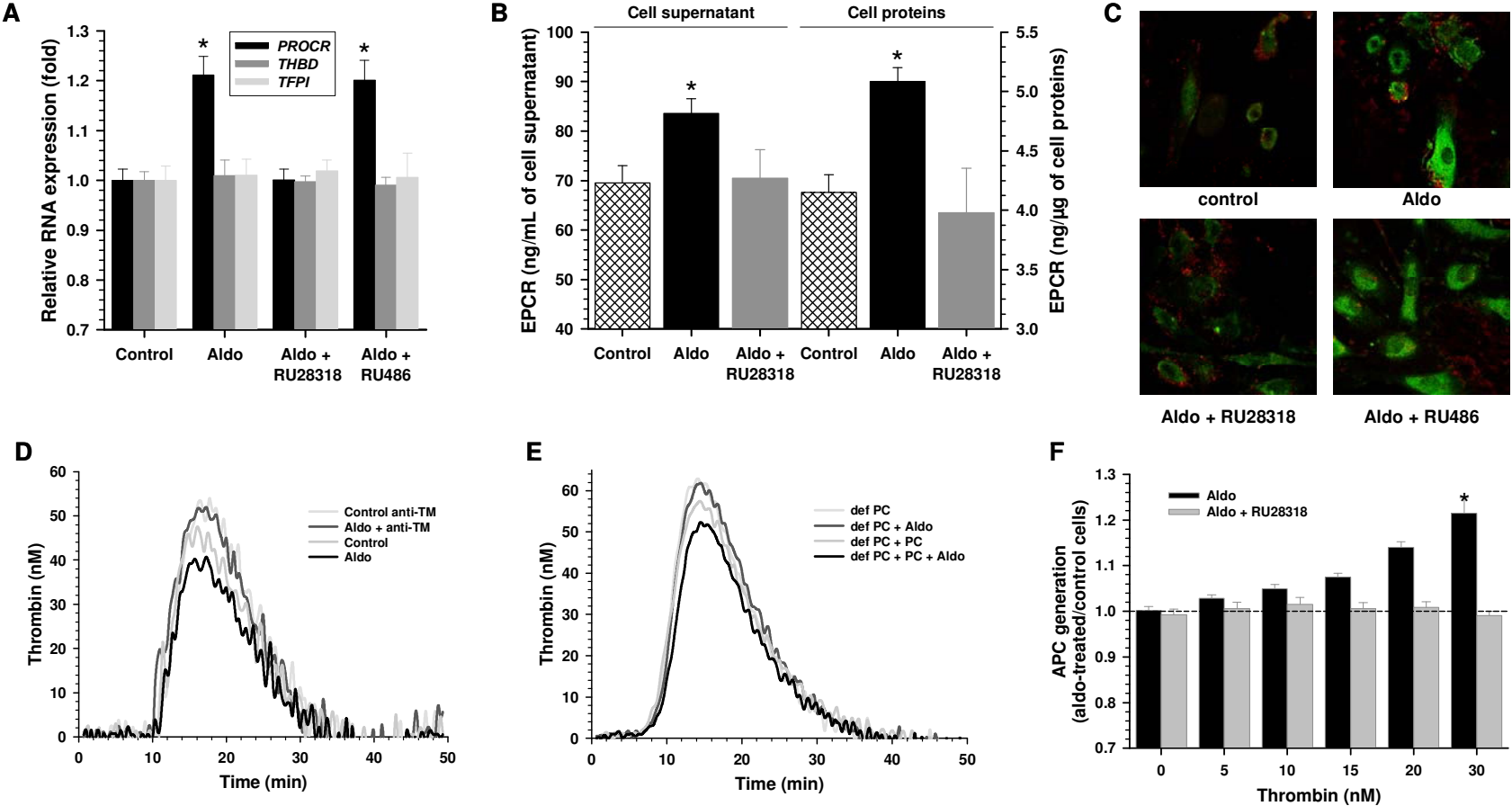


Figure 2



**Figure 3**

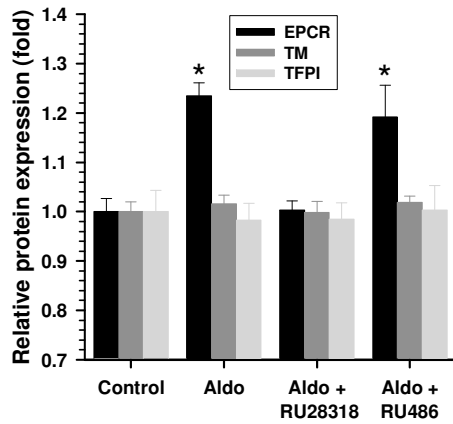




**Supplemental Table I. Primer sequences**

<b>Gene</b>	<b>Forward primer (5' – 3')</b>	<b>Reverse primer (5' – 3')</b>	<b>T<sub>a</sub> (°C)</b>
<i>PROCR</i>	GGCAGTTTCATCATTGCTGG	TTGAACGCC TCAGGTGATTC	62
<i>THBD</i>	TAACGAAGACACAGACTGCATT	CTAGCCCACGAGGTCAAGGT	60.5
<i>TFPI</i>	ATTCACGGTCCCTCATGGTGTCT	GGCGGCATTTCCCAATGACTGAAT	62
<i>GAPDH</i>	CAGCCTCAAGATCATCAGCA	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA	60

## Supplemental Figure I



**Supplemental Figure I. Expression of endothelial protein C receptor (EPCR), thrombomodulin (TM) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in human aortic endothelial cells (HAECs).** Western blot analysis of EPCR, TM and TFPI in human HAECs stimulated for 24 h with  $10^{-8}$  M aldosterone (Aldo),  $10^{-8}$  M aldosterone plus  $10^{-6}$  M RU28318 or  $10^{-8}$  M aldosterone plus  $10^{-6}$  M RU486. Values are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments after normalization to  $\alpha$ -tubulin. \*  $P < 0.05$  versus control.

# Cardiovascular Research

## Vascular smooth muscle cells are responsible for a prothrombotic phenotype of spontaneously hypertensive rat arteries

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Vascular smooth muscle cells are responsible for a prothrombotic phenotype of spontaneously hypertensive rat arteries
<b>Short Title:</b>	Thrombin generation in SHR
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Keywords:</b>	spontaneously hypertensive rat; thrombin generation; tissue factor; arteries; smooth muscle cells
<b>Corresponding Author:</b>	Patrick Lacolley, M.D. , Ph.D. Inserm U961 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, FRANCE
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Inserm U961
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Karima Ait Aissa
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Karima Ait Aissa Jeremy Lagrange Jean-Pierre Max Huguette Louis Benedicte Houppert Athanas Benetos Pascal Challande Denis Wahl Veronique Regnault Patrick Lacolley, M.D. , Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>Aims.</b> The hypothesis that hypertension confers a hypercoagulable state arises from the complications associated with hypertension, stroke and myocardial infarction. Our objective was to determine whether spontaneous hypertension causes changes in the thrombin generating capacity of blood and of the vascular wall.</p> <p><b>Methods and results.</b> 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 prothrombin levels in SHR plasma. In contrast, the addition of thoracic aorta rings of SHR to a Wistar plasma pool resulted in a greater 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 aortic SMCs in SHR than in Wistar. Exposure of negatively-charged phospholipids was higher on SHR than on Wistar aortic rings as well as on SMCs. Tissue factor and TFPI activities were higher in SHR SMCs. These results show opposite thrombin generating capacities 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 greater thrombin</p>

	<p>generation.  Conclusion. These findings suggest that membrane phospholipid reorganization and synthesis of procoagulant molecules in SMCs provide substrates for increased thrombin formation within the vessel wall. Comparison of 5 week-old and 12 week-old rats indicate that established hypertension is required to induce increased thrombin generation within the vessel wall.</p>
<p><b>Suggested Reviewers:</b></p>	<p>Kennedy Cruickshank  King's College London  kennedy.cruickshank@kcl.ac.uk</p> <hr/> <p>PHilippe de Moerloose  University Hospital of Geneva  Philippe.deMoerloose@hcuge.ch</p> <hr/> <p>Luc Van Bortel  Ghent University Hospital  Luc.VanBortel@UGent.be</p> <hr/> <p>Raed Al Dieri  University of Maastricht  R.AIDieri@thrombin.com</p> <hr/> <p>Sami Guermazi  Charles Nicolle Hospital, Tunis  sami.guermazi@rns.tn</p>
<p><b>Opposed Reviewers:</b></p>	

**Vascular smooth muscle cells are responsible for a prothrombotic phenotype of spontaneously hypertensive rat arteries**

**Karima Ait Aissa, Jérémy Lagrange, Jean-Pierre Max, Huguette Louis, Bénédicte Houppert, Athanase Benetos, Pascal Challande, Denis Wahl, Veronique Regnault, Patrick Lacolley**

**Abstract**

**Aims.** The hypothesis that hypertension confers a hypercoagulable state arises from the complications associated with hypertension, stroke and myocardial infarction. Our objective was to determine whether spontaneous hypertension causes changes in the thrombin generating capacity of blood and of the vascular wall.

**Methods and results.** 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 prothrombin levels in SHR plasma. In contrast, the addition of thoracic aorta rings of SHR to a Wistar plasma pool resulted in a greater 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 aortic SMCs in SHR than in Wistar. Exposure of negatively-charged phospholipids was higher on SHR than on Wistar aortic rings as well as on SMCs. Tissue factor and TFPI activities were higher in SHR SMCs. These results show opposite thrombin generating capacities 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 greater thrombin generation.

**Conclusion.** These findings suggest that membrane phospholipid reorganization and synthesis of procoagulant molecules in SMCs provide substrates for increased thrombin formation within the vessel wall. Comparison of 5 week-old and 12 week-old rats indicate that established hypertension is required to induce increased thrombin generation within the vessel wall.

September 6, 2013

Dear Editor,

Please find enclosed a manuscript entitled “Vascular smooth muscle cells are responsible for a prothrombotic phenotype of spontaneously hypertensive rat arteries”.

The manuscript, or part of it, has neither been published (except in form of abstract or thesis) nor is currently under consideration for publication by any other journal.

The submitting author should declare that co-authors have read the manuscript and approved its submission to Cardiovascular Research.

We are looking forward to hearing from you. Thank you very much for your collaboration.

Best regards,

Patrick Lacolley and Veronique Regnault

# **Vascular smooth muscle cells are responsible for a prothrombotic phenotype of spontaneously hypertensive rat arteries**

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>,  
Bénédicte Houppert<sup>1,2</sup>, Athanase Benetos<sup>1,2</sup>, Pascal Challande<sup>3</sup>,  
Denis Wahl<sup>1,2</sup>, Veronique Regnault<sup>1,2\*\*</sup>, Patrick Lacolley<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U1116, Vandœuvre-lès-Nancy, France

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

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

\* share first authorship

\*\* contributed equally to this work

Short title: thrombin generation in SHR

Text including the abstract, manuscript text, references and figure legends: 5613 words

Abstract: 250 words

Corresponding authors:

Patrick Lacolley and Veronique Regnault, Inserm U1116, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel 33 3 83683621, Fax 33 3 83683639; mail: patrick.lacolley@inserm.fr and veronique.regnault@inserm.fr

## **Abstract**

**Aims.** The hypothesis that hypertension confers a hypercoagulable state arises from the complications associated with hypertension, stroke and myocardial infarction. Our objective was to determine whether spontaneous hypertension causes changes in the thrombin generating capacity of blood and of the vascular wall.

**Methods and results.** 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 prothrombin levels in SHR plasma. In contrast, the addition of thoracic aorta rings of SHR to a Wistar plasma pool resulted in a greater 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 aortic SMCs in SHR than in Wistar. Exposure of negatively-charged phospholipids was higher on SHR than on Wistar aortic rings as well as on SMCs. Tissue factor and TFPI activities were higher in SHR SMCs. These results show opposite thrombin generating capacities 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 greater thrombin generation.

**Conclusion.** These findings suggest that membrane phospholipid reorganization and synthesis of procoagulant molecules in SMCs provide substrates for increased thrombin formation within the vessel wall. Comparison of 5 week-old and 12 week-old rats indicate that established hypertension is required to induce increased thrombin generation within the vessel wall.

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



## **Introduction**

It is still unclear whether hypertension causes a prothrombotic state in blood and within the vessel wall, although compelling clinical and experimental evidence points towards an impairment of the hemostatic balance in blood brought about 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 and protein C suggest rather the opposite view, that hypertension may promote anticoagulant systems. In spontaneously hypertensive rats (SHR), in deoxycorticosterone acetate-induced hypertensive rats and in endothelial dysfunction-induced experimental hypertension, a hypercoagulable state was demonstrated by elevated levels of thrombin-antithrombin (TAT) complexes, as well as D-dimers, and supported by an increase in tissue factor<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 antithrombin.<sup>6</sup> In stroke-prone SHR the reduction of factor Xa 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 not been well documented. Early works focused primarily on the increased vascular expression of tissue factor 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 overall 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> which appears 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 tissue factor-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 cause an increased thrombin generating capacity, both in the blood and within the vascular wall, since SMC phenotypic modulation is a hallmark of hypertension.

## **Methods**

### ***Animals***

Five week-old and 12 week-old, male SHR and Wistar rats 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 and all procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Systolic blood pressure was measured using a tail-cuff blood pressure analyzer (Blood Pressure Analysis System, model SC-1000; Hatteras Instruments, Cary, NC) on conscious animals.

### ***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 endothelial cells (ECs) were

isolated from a second set of 8 SHR and 8 Wistar rats at each age 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 (7500 cells/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 the volume of 0.106 M sodium citrate. Blood was centrifuged at 194g for 10 minutes at room temperature to obtain platelet-rich plasma and then at 1750g for 10 minutes to obtain platelet-poor plasma. Platelet-rich plasma was adjusted to  $500 \times 10^9$  platelets/L by addition of autologous platelet-poor plasma. Platelet-free plasma was obtained by centrifugation of platelet-poor plasma at 13000g for 30 minutes at 4 °C, 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 Gervais, 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 minute 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). Antithrombin levels were measured with the Coamatic® antithrombin test kit from Chromogenix, and TAT with the Enzygnost® TAT micro (Instrumentation Laboratory). Circulating von Willebrand factor antigen was measured by ELISA (Asserachrom®, Diagnostica Stago). Each plasma sample was assayed at two

different dilutions chosen in order to interpolate results, expressed as percentages, using the calibration curve obtained with the human calibrator supplied within the kit.

### ***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 reported previously.<sup>19,20</sup> Coagulation was triggered by recalcification in the presence of recombinant human tissue factor (Dade Behring, Marburg, Germany). Round-bottom 96-well Greiner blue plates were used for platelet-rich and platelet-free plasmas, and MICROTEST™96 plates for SMC or EC monolayers. For measurements in platelet-free plasma, a mixture of phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine (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 activated factor X (1.2 nM), activated factor V (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 activated factor X-activated factor V-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 minutes before kinetic readings were taken over 10 minutes. Phospholipid concentration was estimated from the initial rate of thrombin formation by reference to a standard curve

constructed with a mixture of phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine (20:20:60 mole%), and expressed as phosphatidylserine equivalents.

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

Tissue factor and TFPI activities were measured in plasma, and in 200  $\mu$ L HBS incubated for 1 hour at room temperature with aortic rings using the Actichrome® tissue factor and Actichrome® TFPI activity assay respectively (American Diagnostica, Stamford, CT). To measure cell surface tissue factor 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 Supplementary material online.

### ***Immunohistochemistry***

Please see Supplementary material online.

### ***Annexin V/propidium iodide double staining assay***

Please see Supplementary material online.

### **Cell proliferation assay**

Please see Supplementary material online.

### **Statistical analysis**

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

## **Results**

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

The weight of SHR rats was lower at both 5 and 12 weeks of age compared with age-matched Wistar rats. We found that arterial blood pressure was already increased in SHR compared with Wistar at 5 weeks of age. This difference was more pronounced at 12 weeks of age (*Table 1*).

Red cell count, hematocrit and hemoglobin were higher in the SHR as compared with the Wistar rats (*Table 1*). At 12 weeks of age, platelet and mean platelet volume were also higher in SHR than in Wistar rats.

Regarding plasma levels of hemostatic factors, plasma levels of prothrombin were significantly lower while TFPI activity was higher in SHR than in Wistar rats at 5 weeks of age. At 12 weeks of age, plasma levels of tissue factor activity and prothrombin were significantly lower while TFPI activity was higher in SHR than in Wistar rats. Similar levels of antithrombin and TAT were observed in the two groups of rats at each age. Livers from 12 week-old SHR showed lower levels of prothrombin (vitamin K-dependent factor) and factor V (whose synthesis is independent of vitamin K) mRNA expression (*F2/Hprt1*:  $1.3 \pm 0.1$  versus  $1.8 \pm 0.2$ ,  $P=0.038$ , and *F5/Hprt1*:  $1.8 \pm 0.2$  versus  $3.6 \pm 0.4$ ,  $P=0.008$ ;  $n=9$  in each group).

To assess the degree of activation of the endothelium, we have measured plasma levels of von Willebrand factor in both Wistar and SHR rats. We found an increase in von Willebrand

factor in 12 week-old SHR compared to age-matched Wistar. This difference was not observed in 5 week-old rats.

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

When the thrombin-forming capacity of blood was examined by an overall function test, significantly lower thrombin generating capacity was observed in SHR plasma compared with Wistar plasma at both ages. *Figures 1A and 1B* show typical thrombin generation profiles in platelet-free plasma triggered with high concentrations of tissue factor. The peak height was lower in SHR plasma. Lower levels of tissue factor-induced thrombin generation were observed both in SHR platelet-rich and platelet-free plasmas, whatever the concentration of tissue factor used to trigger coagulation (*Figure 1C*). As expected, at low tissue factor concentrations thrombin generation was enhanced in the presence of cell surfaces (platelets) compared with synthetic phospholipids (phosphatidylserine/phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine mixture). *Figure 2A* shows that addition of purified prothrombin to SHR plasma induced a concentration-dependent increase in ETP whereas addition of prothrombin to Wistar rat platelet-free plasma resulted in a modest increase in ETP. In addition, dilution of Wistar and SHR platelet-free plasma reduced the differences in thrombin generation between the two strains (*Figure 2B*).

### ***Aortic rings from 12 week-old SHR display higher thrombin-generating capacity than age-matched Wistar rings***

When compared with 50 pM tissue factor alone (a concentration chosen to be close to levels of tissue factor expressed by rings), addition of aortic rings from Wistar rat or SHR to a Wistar rat or SHR plasma pool significantly increased ETP values at 12 weeks but not at 5 weeks of age. Analysis of the kinetics of thrombin formation and inactivation revealed a marked difference in peak height (*Figure 3A and B*). This procoagulant activity was greater for SHR than for Wistar rings (*Figure 3C*). We also tested the effect of aortic rings of each animal in its own plasma and found no differences between Wistar and SHR.

When compared with Wistar rings, the higher procoagulant phenotype of 12 week-old SHR aortic rings seemed to be unrelated to the expression of tissue factor or TFPI activity since SHR rings expressed a non-significantly lower tissue factor 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*). As expected, such differences were not observed at 5 weeks of age.

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

When compared with ECs (CD31- and von Willebrand-positive cells), SMCs ( $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells), whatever their origin (12 week-old 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 platelet-free plasma pool. The times to thrombin burst and peak were significantly shortened and the peak, velocity index and ETP values (*Figure 4B*) were higher for SMCs compared with ECs. Whereas no differences were observed in the thrombin generation patterns and parameters between SHR and Wistar ECs, a higher thrombin peak and ETP were obtained with SHR SMCs compared with Wistar SMCs. Thrombin generation at the surface of SMCs from 5 week-old SHR and Wistar rats was similar (ETP values were  $525 \pm 18$  and  $559 \pm 20$  nM.min respectively).

For both 12 week-old SHR and Wistar rats, tissue factor activity was about 20-fold higher in SMCs compared with ECs. SMC expression of tissue factor and of TFPI was higher in SHR than in Wistar while no differences were observed for ECs between the two strains (*Table 2*). Measurement of the negatively-charged membrane phospholipids revealed higher phosphatidylserine exposure on SHR than on Wistar SMCs. On the contrary, there was only a slight decrease in SMC expression of tissue factor in 5 week-old SHR.

To determine whether an increase in hemodynamic forces can enhance thrombin generation at the surface of SMCs, we have measured the procoagulant activity of SMCs from Wistar rats subjected to cyclic stretch (1 Hz, 15% elongation). We observed a time-



dependent increase in PPA in response to 15% stretch for 6 hours (Supplementary material online *Figure S1A*). We also examined the externalization of phosphatidylserine and the permeability to propidium iodide (PI) as markers of apoptosis using flow cytometry in SMCs from 5 and 12 week-old Wistar and SHR rats. The increase in exposure of phosphatidylserine in response to stretch was higher in SMCs from 12 week-old SHR compared to age-matched Wistar rats and younger rats (Supplementary material online *Figure S1B*).

To illustrate the cellular effects of thrombin, we investigated the proliferation of SMCs in response to thrombin (0.5 U/mL) in the presence or not of the PAR-1 antagonist SCH-79797 (100 nM). Thrombin-induced proliferation was higher in SMCs from SHR than in those from Wistar rats and this difference was amplified at 12 weeks of age compared with 5 weeks of age (Supplementary material online *Figure S2*). Enhancement of SMC proliferation by thrombin was fully suppressed by the PAR-1 antagonist SCH-79797.

## **Discussion**

This study has demonstrated lower thrombin generation in SHR plasma related to decreased prothrombin, which contrasts with higher thrombin generation on aortic wall conferred by procoagulant activities of SMCs from 12 week-old SHR. Our findings have also evidenced that established hypertension is required to induce increased thrombin generation within the vessel wall and subsequent SMC phenotypic changes.

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 the 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 levels were not statistically higher in SHR

compared to Wistar. 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 picture of the overall hemostatic function.

The hypocoagulable phenotype in SHR plasma was unlikely to be influenced by platelets since similar results were obtained in platelet-rich and platelet-free plasmas. 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 plasma coagulation factors. Similar differences in ETP values between SHR and Wistar at low tissue factor concentrations, presumably close to the physiological range, and at very high tissue factor concentrations preclude a prominent role of tissue factor and TFPI in the lower thrombin generation in SHR plasma. Prothrombin, antithrombin and free TFPI have been identified as major determinants of ETP values.<sup>25,26</sup> The lower level of prothrombin in SHR compared with 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 strain. Dilution of platelet-free plasma in the thrombin generation assay decreases the anticoagulant role of antithrombin. Under these conditions, the assay is less sensitive to the concentration of prothrombin. The finding that dilution of Wistar and SHR platelet-free plasma reduced the differences in thrombin generation between the two strains is in favour of a predominant contribution of prothrombin to the lower thrombin generation in SHR platelet-free plasma. 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 *F5* mRNA in SHR rules out a functional vitamin K deficiency. Similar plasma levels of antithrombin suggest the absence of established liver failure. In addition, we did not detect any ventricular hypertrophy in 12 week-old SHR compared with Wistar rats, thus ruling out

the hypothesis of early liver function impairment in relation with cardiac hypertrophy.

However, the increase in hypertension-induced arterial stiffness in 12 week-old SHR may favour the onset of ventricular hypertrophy.<sup>27</sup> Finally low levels of prothrombin already present at 5 weeks of age in SHR argue for a genetic determinant, despite the absence of any previous reports in the literature.

Our observation of a higher level of TFPI secreted by aortic rings from adult SHR compared to 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>28</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 12 week-old SHR aortic rings to a Wistar or SHR plasma pool conferred a hypercoagulable state compared to Wistar rings. The increase in von Willebrand factor in 12 week-old SHR compared to age-matched Wistar suggests that aortic rings of SHR may present activated endothelium and thereby may contribute to this hypercoagulable state via contact of blood coagulation factors with SMCs.<sup>29</sup> Such a phenotype appears to be related to established hypertension since it was not observed at 5 weeks of age. When the aortic ring of each animal was added to its own plasma the lack of difference between Wistar and SHR indicated that the intrinsic procoagulant effect of SHR rings neutralizes the lower thrombin-generating capacity of plasma alone. In this context, we would not expect a difference in the incidence of thrombosis in Wistar and SHR but an exacerbation of the cellular effects of thrombin. Indeed, the increase in thrombin generation within the vessel wall may modulate several well-known vascular processes involved in hypertension, such as regulation of vascular tone and proliferation of SMCs, leading to increased pulse pressure and arterial stiffening.<sup>29,30</sup> (The greater effect of thrombin on SMC proliferation in 5 week-old and 12 week-old SHR and its inhibition by SCH-79797 argues for predominant cellular effects of thrombin via a PAR-1-dependent mechanism in hypertension.

Our data demonstrate that ETP values in plasma were higher when adherent SHR rather than Wistar SMCs were used as cellular surfaces whereas no difference existed 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 of the steps of the coagulation cascade. Exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of platelets<sup>31</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 findings 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 adult SHR may be related to the hypertension-induced elevation of intracellular calcium<sup>32</sup> promoting the flip-flop process<sup>33</sup> and the structural reorganisation of cellular membranes in SHR. The greater increase in exposure of phosphatidylserines in response to stretch in SMCs from 12 week-old SHR compared to age-matched Wistar rats supports the hypothesis that elevated thrombin production in aortic rings of SHR is the consequence of higher procoagulant activity of SMCs in hypertensive animals.

Thrombin generation is initiated by tissue factor and the aortic layer represents a source of increased tissue factor in hypertension.<sup>4</sup> Compared with Wistar rats, we observed in SHR higher levels of tissue factor associated with SMCs. The high level of tissue factor activity on adherent cultured SMCs contrasts with the low level of TFPI activity. It is unlikely that TFPI plays a major down-regulating role in thrombin generation on SMCs in either strains since TFPI is known to dampen the burst of thrombin in response to a small procoagulant stimulus<sup>34</sup>. There is increasing evidence that specific binding proteins on membranes regulate the formation of coagulation complexes by localizing coagulation factors to cell surfaces.<sup>31</sup> Increased integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression in the vessel wall of SHR has been reported previously<sup>35</sup>. We can anticipate a synergistic effect between anionic phospholipid

membranes, tissue factor and integrin  $\alpha_v\beta_3$  on thrombin generation in the SHR vascular wall since this integrin is the receptor for prothrombin in SMCs<sup>36</sup>.

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 SHR thrombin generation may also be increased by vascular SMCs even when thrombin generation in plasma is not increased. Increased thrombin generation due to SMCs may also have cellular effects within the vessel wall, in particular mitogenic effects on SMCs and ECs. The potential benefit of direct thrombin inhibitors should be investigated both on hemostatic balance and on the cellular phenotypic modulation in hypertension and thrombotic related diseases.

### **Sources of funding**

This work was supported by the “Region Lorraine”, the Communauté Urbaine du Grand Nancy and the ANR program ANR- 09-GENO-010.

### **Acknowledgments**

The authors thank Mary Osborne-Pellegrin for editing this manuscript.

### **Conflict of Interest**

None declared.

### **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, Enjyoji 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, Wagenvoord 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. Bezie Y, Lamaziere JM, Laurent S, Challande P, Cunha RS, Bonnet J, Lacolley P. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;**18**:1027-1034.
28. 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.
29. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res*. 2012;**95**:194-204.



30. Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res.* 2009;**82**:392-403.
31. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;**22**:1381-1389.
32. 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.
33. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;**31**:15-26.
34. Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;**28**:233-242.
35. 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.
36. 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 B) and endogenous thrombin potential (ETP) values (C) in platelet-rich plasma adjusted to  $500 \times 10^9$  platelets/L or in platelet-free plasma + 4  $\mu$ M phosphatidylserine/phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine vesicles. Coagulation was triggered with either low (0.5 pM) or high (50 pM) concentrations of tissue factor. Results are means $\pm$ SEM of 8 to 13 different plasmas tested in triplicate; \*  $P < 0.05$  vs Wistar; †  $P < 0.05$  vs platelet-rich plasma with the same tissue factor concentration.
- Figure 2. *Dependence of thrombin generation on prothrombin levels.* (A) Purified bovine prothrombin was added to SHR or Wistar platelet-free plasma (PFP) and thrombin generation was triggered by 0.5 pM of tissue factor in the presence of 4  $\mu$ M phosphatidylserine/phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine 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. (B) Effect of plasma dilution on the ETP ratio between Wistar and SHR PFP. Results are means $\pm$ SEM of 5 experiments. \*  $P < 0.05$  vs the ratio obtained with undiluted PFP.
- Figure 3. *Thrombin generation in the presence of aortic rings.* Representative thrombin generation curves (A and B) and endogenous thrombin potential (ETP) values (C) in a Wistar platelet-free plasma (PFP) pool triggered with 50 pM tissue factor (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 aortic smooth muscle cells (SMCs) and endothelial cells (ECs).* Representative thrombin generation curves (A) and endogenous thrombin potential (ETP) values (B) in a Wistar platelet-free plasma pool added to washed SMC or EC monolayers from 12 week-old rats. Results are means±SEM of 12 experiments; \*  $P<0.05$  vs Wistar.

**Table 1. Hematologic analysis**

	5 week-old rats		12 week-old rats	
	Wistar	SHR	Wistar	SHR
Weight (g)	141±2	94±5 *	349±8	273±4 *
Conscious SBP (mmHg)	131±2	156±9 *	143±2	189±4 *
<b>Blood cell count</b>				
Red blood cells (×10 <sup>12</sup> /L)	4.76±0.06	5.21±0.08 *	6.02±0.16	7.34±0.03 *
White blood cells (×10 <sup>9</sup> /L)	2.9±0.4	3.4±0.2	3.2±0.3	3.1±0.1
Platelets (×10 <sup>9</sup> /L)	569±27	531±18	429±21	527±14 *
Hematocrit (%)	29.1±0.3	31.0±0.5 *	32.2±0.9	36.6±0.3 *
Hemoglobin (g/dL)	9.7±0.2	10.2±0.1 *	11.6±0.3	12.8±0.1 *
Mean platelet volume (fL)	6.2±0.2	6.4±0.2	6.6±0.1	7.9±0.2 *
<b>Plasma levels of hemostatic factors</b>				
Tissue factor (pmoles/L)	11.9±1.3	9.7±1.2	3.7±0.8	1.2±0.3 *
TFPI (U/mL)	6.4±0.5	9.5±0.8 *	4.5±0.4	6.9±0.2 *
Prothrombin (%)	60±2	53±1 *	83±4	58±4 *
Antithrombin (%)	124±5	118±5	107±7	100±4
von Willebrand factor (%)	43±3	45±3	34±2	50±1 *
TAT complexes (ng/mL)	6±1	20±9	55±13	49±10

SBP, systolic blood pressure; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; TAT, thrombin-antithrombin

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

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

	5 week-old rats		12 week-old rats	
	Wistar	SHR	Wistar	SHR
<b><i>Aortic rings</i></b>				
Tissue factor (pmoles/L)	23±3	18±2	93±8	76±9
TFPI (U/mL)	0.107±0.003	0.101±0.006	0.10±0.01	0.14±0.01 *
PPA (nM eq PS / g of ring)	1.59±0.05	1.58±0.05	1.86±0.17	3.44±0.38 *
<b><i>Aortic smooth muscle cells</i></b>				
Tissue factor (pmoles/L)	6.4±0.2	4.9±0.2 *	29±2	37±2 *
TFPI (U/mL)	0.012±0.001	0.012±0.001	0.009±0.002	0.038±0.004*
PPA (nM eq PS / mL)	418±20	433±15	450±13	725±13 *
<b><i>Aortic endothelial cells</i></b>				
Tissue factor (pmoles/L)	ND	ND	1.5±0.2	1.8±0.5
TFPI U/mL)	ND	ND	0.020±0.002	0.020±0.001

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

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

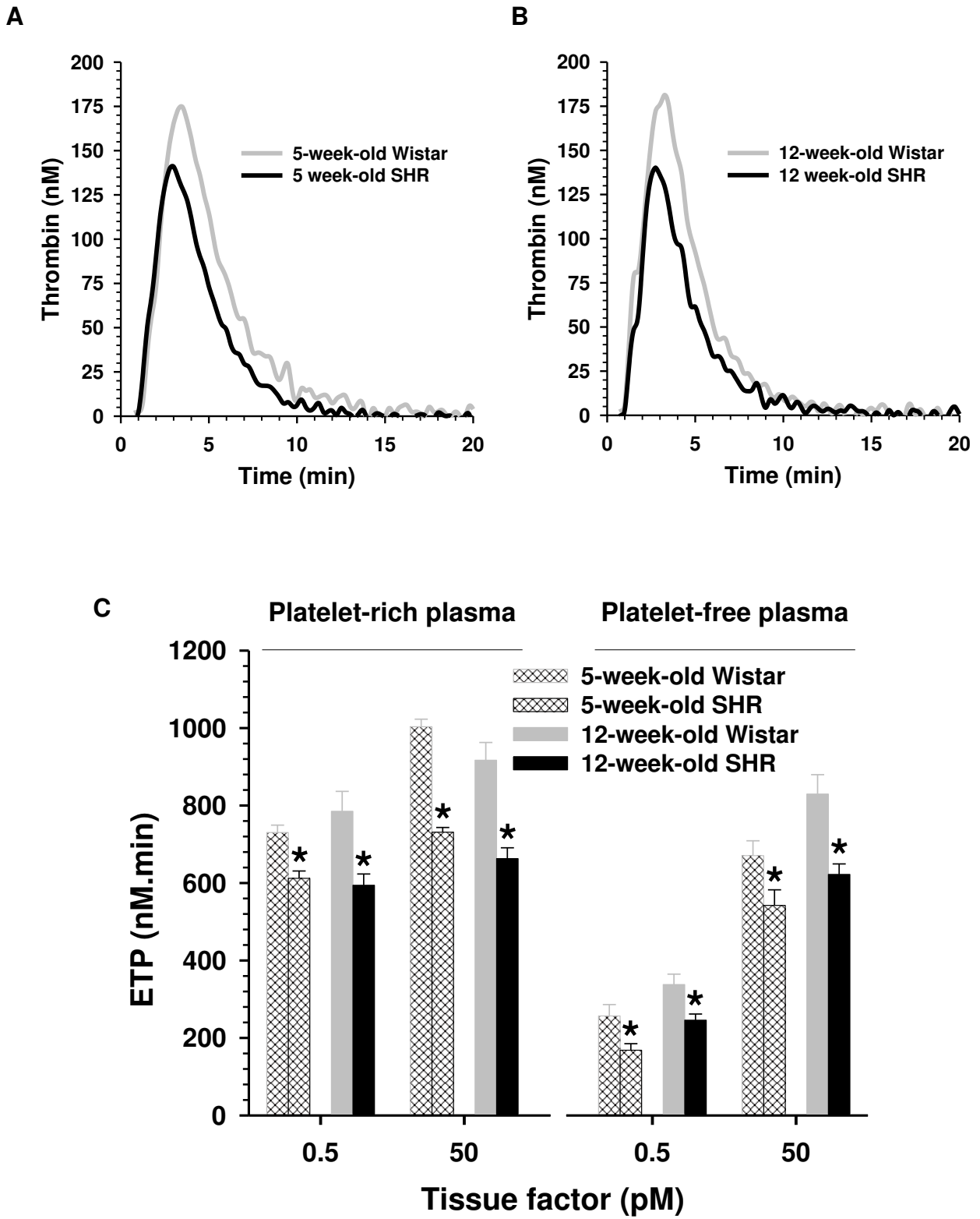


Figure 1

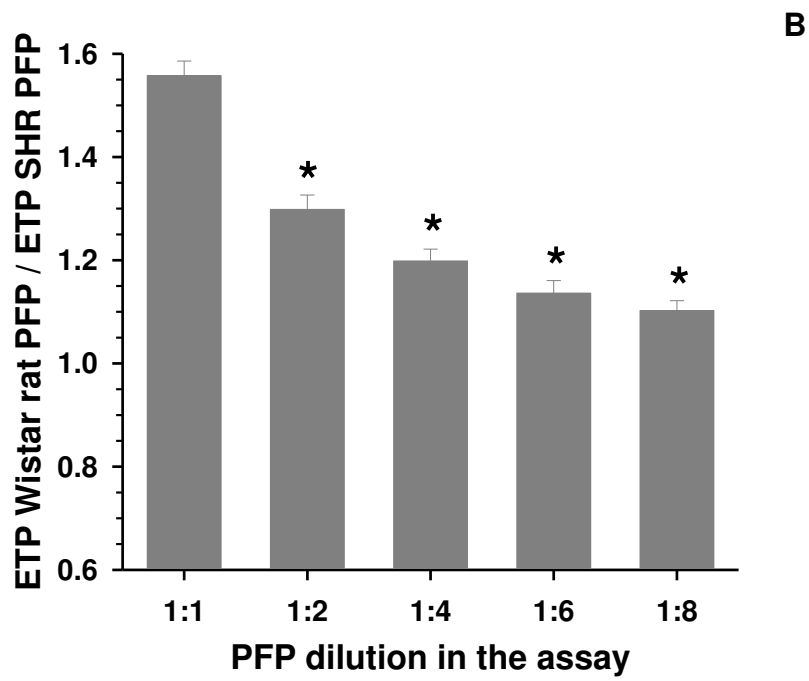
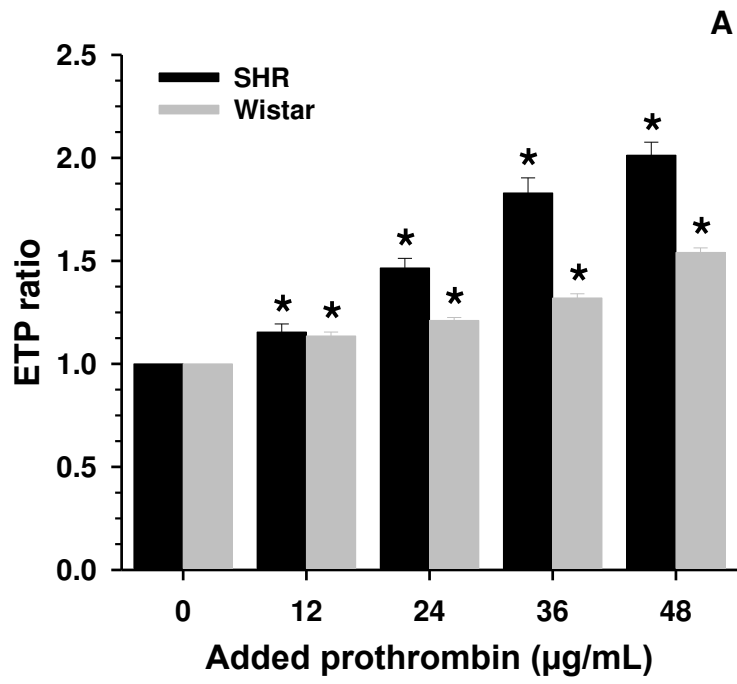


Figure 2

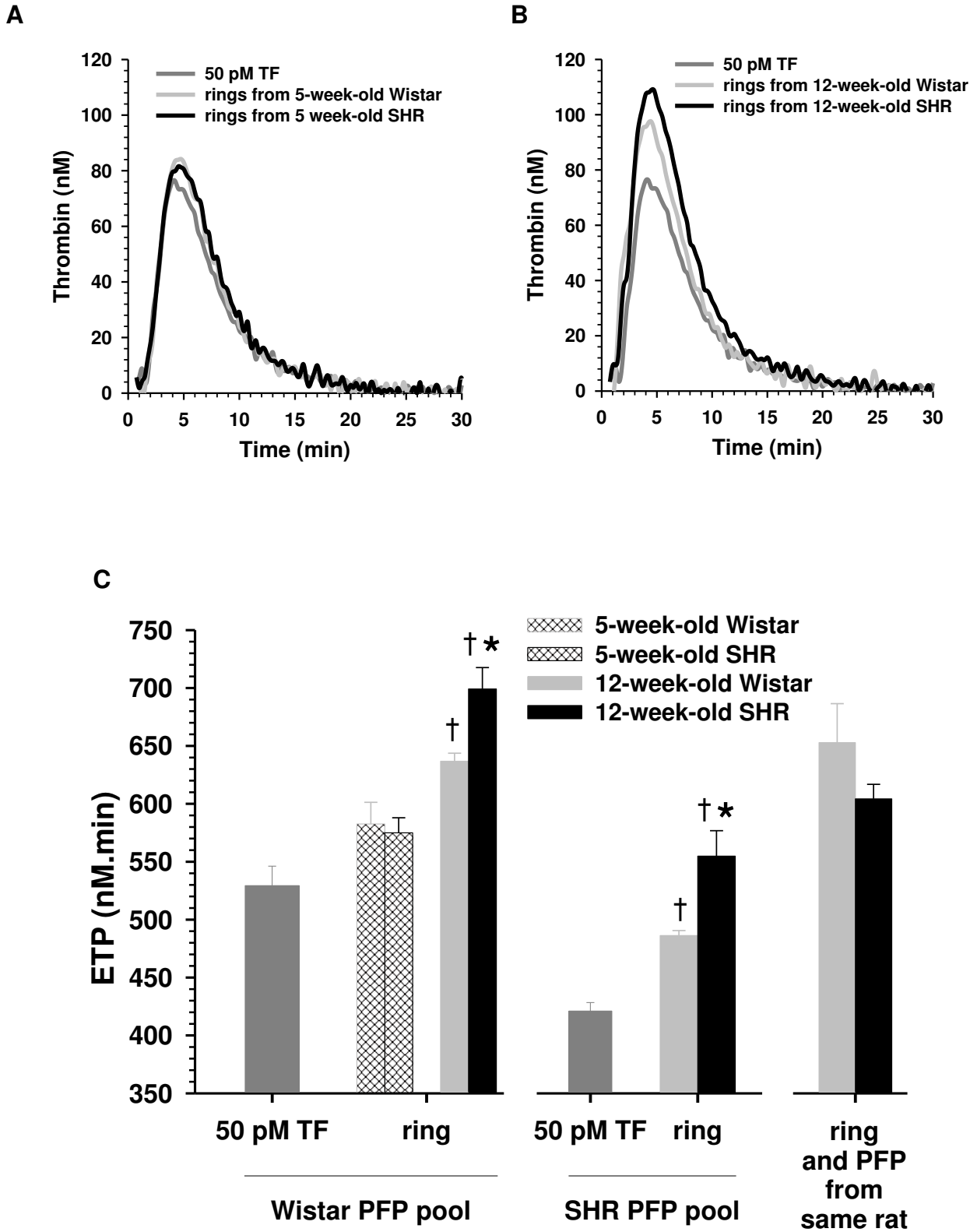


Figure 3



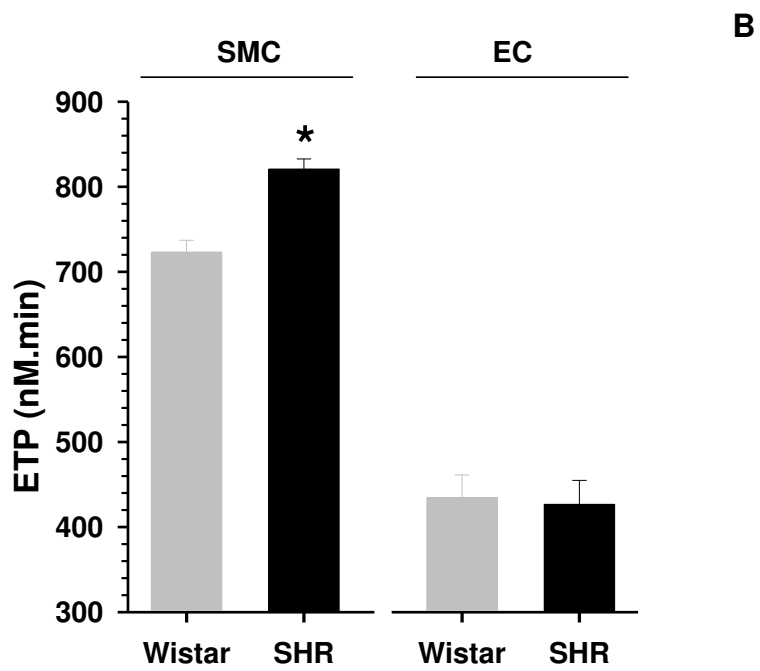
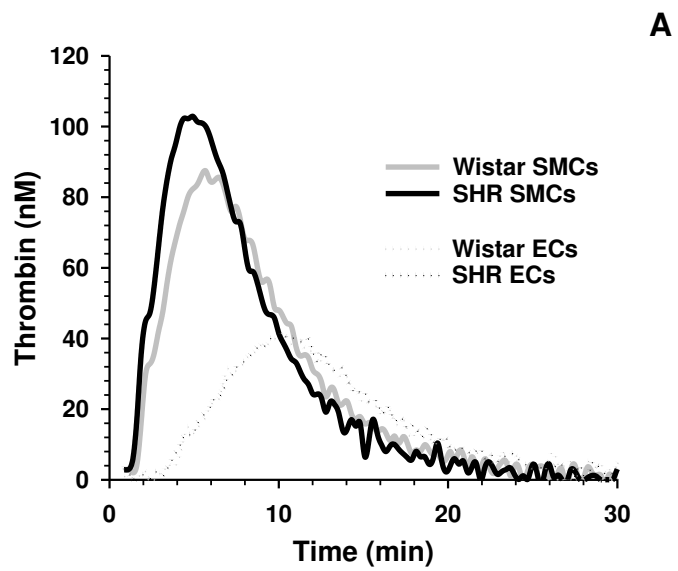


Figure 4

## SUPPLEMENTARY MATERIAL ONLINE

### **Vascular smooth muscle cells are responsible for a prothrombotic phenotype of spontaneously hypertensive rat arteries**

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>,

Bénédicte Houppert<sup>1,2</sup>, Athanase Benetos<sup>1,2</sup>, Pascal Challande<sup>3</sup>,

Denis Wahl<sup>1,2</sup>, Veronique Regnault<sup>1,2\*\*</sup>, Patrick Lacolley<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U1116, Vandœuvre-lès-Nancy, France

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

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

\* share first authorship

\*\* contributed equally to this work

Corresponding authors:

Patrick Lacolley and Veronique Regnault, Inserm U1116, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel 33 3 83683621, Fax 33 3 83683639; mail: [patrick.lacolley@inserm.fr](mailto:patrick.lacolley@inserm.fr) and [veronique.regnault@inserm.fr](mailto:veronique.regnault@inserm.fr)

## **Expanded Materials and Methods**

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

The primer sequences, designed using Primer3 software (<http://biotools.umassmed.edu/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), were as follows:

F2: 5'-TGAAGACCCCTACAACCAG-3' and 3'-TCCACCTTTTCAGACGAAC-5'

F5: 5'-GAGAATCCCGATGAGGTGAA-3' and 3'-GTGCCTCCTCCCATAGATGA-5'

Hprt1: 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3' and 3'-CCCTCAAGATTGTCAGCAA-5'

### **Immunohistochemistry**

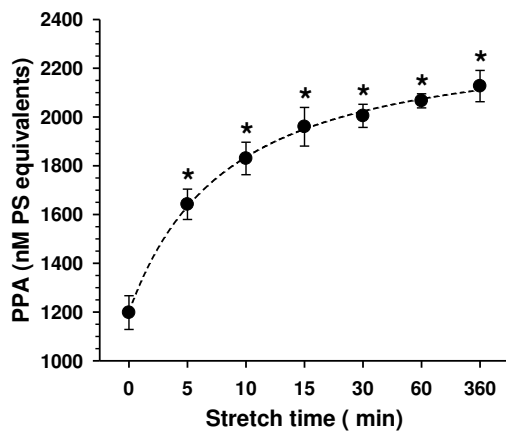
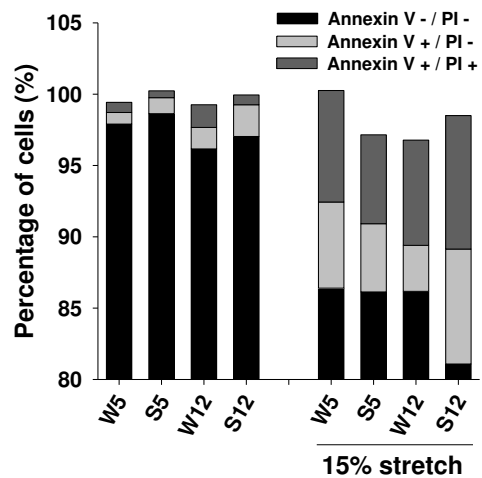
Smooth muscle cells (SMCs) and endothelial cells (ECs) were grown in Lab-Teks (Nunc A/S, Roskilde, Denmark), then rinsed with phosphate buffered saline (PBS), fixed, and permeabilized with cold methanol for 10 minutes. Cells were incubated with primary and secondary antibodies in BSA/PBS 1% for 1 hour. SMCs were labelled by  $\alpha$ -smooth muscle actin (clone 1A4, Sigma, St. Louis, MO, USA), ECs were stained by CD31 (rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, UK) and von Willebrand factor (rabbit polyclonal Abcam). Cell-bound primary antibodies were detected using the biotinylated antibody-streptavidin-peroxidase detection system (Dako, Glostrup, Denmark). Bound peroxidase was identified using the Novared detection system (Vector Laboratories Ltd, Peterborough, UK).

### **Annexin V/propidium iodide double staining assay**

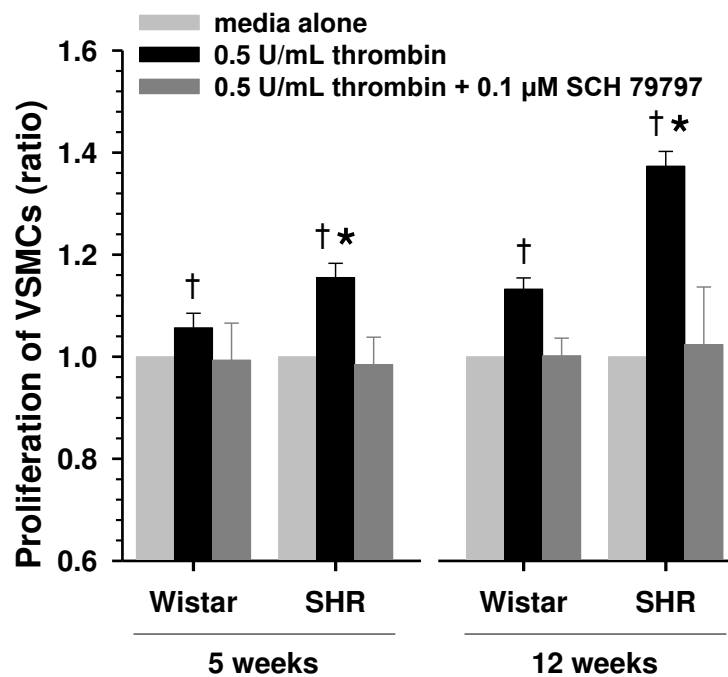
Apoptosis was examined by a double staining method using the fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labelled annexin V/propidium iodide (PI) apoptosis detection kit (Beckman) according to the manufacturer's instructions. Briefly, trypsinized SMCs were washed twice with PBS, and stained with FITC-conjugated annexin V and PI dyes. The externalization of phosphatidylserine (PS) and the permeability to PI were evaluated by flow cytometry on a Gallios flow-cytometer (Beckman Coulter). Data from 10,000 events per sample were collected. Cells in early stages of apoptosis were positively stained with annexin V, whereas cells in late apoptosis or necrosis were positively stained with both annexin V and PI.

### **Cell proliferation assay**

SMCs were seeded at a density of  $10^4$  cells/well in 24-well plates. At 60-80% confluence, cells were washed with PBS and then starved for 24 h in DMEM/F12 without serum. Medium was then replaced with fresh serum-free DMEM/F12 containing 0.5 U/mL bovine thrombin (Synapse B.V., Maastricht, The Netherlands), with or without the protease-activated receptor 1-selective antagonist SCH-79797 for 24 h. Cells were counted after trypsinization in a Scepter™. 2.0 Handheld Automated Cell Counter (Millipore).

**A****B**

**Figure S1.** Effect of hemodynamic forces on the externalization of phosphatidylserine (PS) and apoptosis of SMCs. (A) SMCs from 12 week-old Wistar rats subjected to cyclic stretch for the indicated time period were harvested and adjusted to  $3 \times 10^6$  cells/mL in the assay buffer for phospholipid procoagulant activity (PPA) measurement. Results are means  $\pm$  SEM of 3 experiments performed in triplicate. \*  $P < 0.05$  versus unstretched cells using a paired Student's t test. (B) FACS analysis by double staining with annexin V and propidium iodide (PI) of unstretched and stretched rat SMCs from 5 week-old Wistar rats and SHR (W5 et S5 respectively) and 12 week-old Wistar rats and SHR (W12 et S12 respectively). Results are means  $\pm$  SEM of 3 experiments. A significant increase in exposure of PS assessed by annexin V staining was found in SMCs from 12 week-old SHR rats compared to age-matched Wistar rats.



**Figure S2.** Effect of thrombin and of the protease-activated receptor 1-selective antagonist, SCH-79797, on SMC proliferation. SMCs were cultured in media without serum for 1 day before stimulation for 24 h with 0.5 U/mL bovine thrombin in the absence or presence of 0.1 μM SCH-79797. Results (means±SEM of 5 experiments) are expressed as ratios of the number of cells obtained in unstimulated wells (media alone). \* P<0.05 versus SMCs from Wistar rats at the same age; † P<0.05 vs media alone.

# Hypertension, hypercoagulability and the metabolic syndrome: A cluster of risk factors for cardiovascular disease

Xianqing Mao, Karima Ait-Aissa, Jeremy Lagrange, Gina Youcef and Huguette Louis\*

*INSERM, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, France  
Nancy Université, Nancy, France*

**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.

**Keywords:** Hypertension, hypercoagulability, metabolic syndrome, animal model

## 1. 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 mmHg), 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.

---

\* Address for correspondence: 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 3 83683639; E-mail: huguette.louis@inserm.fr.



## 2. 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<sup>ob/ob</sup>*) 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<sup>db/db</sup>*) 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]



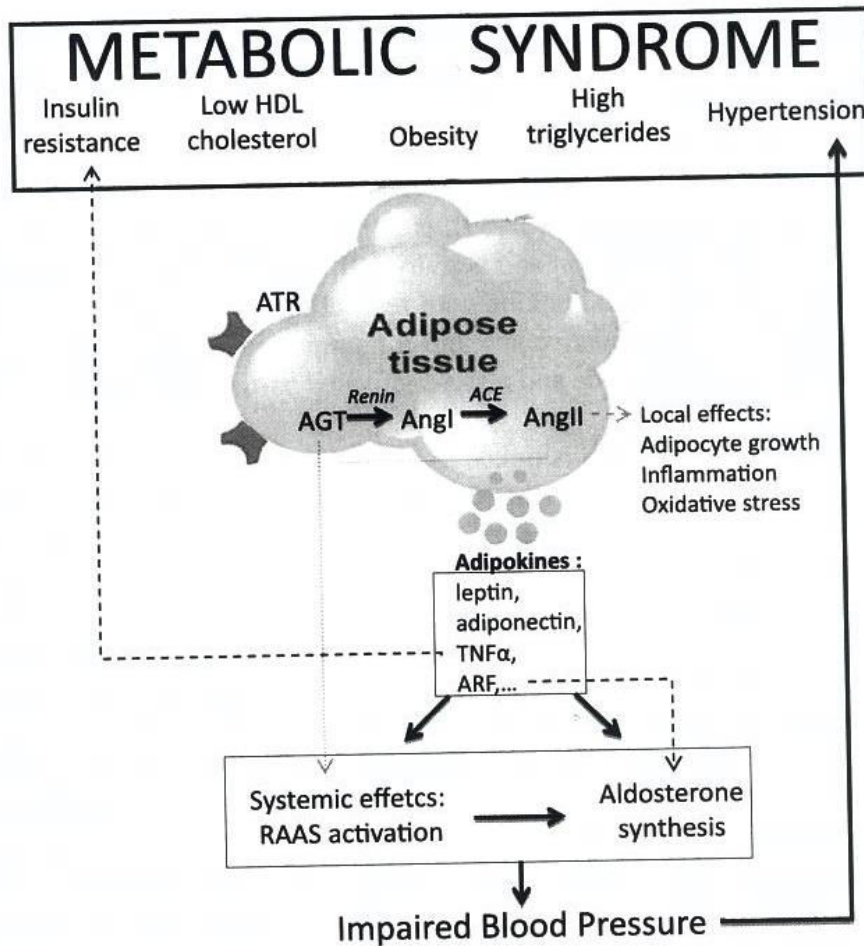


Fig. 1. Proposed relation between metabolic syndrome and obesity-related-hypertension. Ang: angiotensin; ACE: angiotensin converting enzyme; ATR: angiotensin receptor; AGT: angiotensinogen; TNF- $\alpha$ : tumor necrotic factor-alpha. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-2012-0688>.)

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 (Fig. 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.

### 3. 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 P2y12 signaling [60]. Elevated FFA concentrations and hypertriglyceridaemia exert a proaggregating effect *in vitro* [61]. FFA levels are correlated with CD36 (Cluster of differentiation 36) mRNA expression [62] and the CD36 ligand facilitates the supply of FFAs for platelet thromboxane production which stimulates collagen-induced platelet aggregation [63].

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



MP release is associated with inflammation and by transporting molecules such as TF or CD36 could participate in the increased coagulation and thrombogenicity found in MetS.

#### 4. 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 (Table 1).

#### 5. 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 *falfa* 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 (*falfa*) 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 fibrocellular 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

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

Model	Description	Hyperlipidemia	IR	Hypertension	Hypercoagulability	Model for studying	References
Rat	Obese Zucker	Yes	Yes	Yes	Prothrombotic state	MetS and interactions with hypertension	[69,70,107-109]
	SHR-SP	No	Yes	Yes	Hemorrhagic lesions, hypocoagulable state	Hypertension and interaction with coagulation	[72,75,76]
	SHR-SP fatty	Yes	Yes	Yes	ND	Obesity, hyperlipidemia and interaction with hypertension	[71-73]
	Obese SHR	Yes	Yes	Yes	ND	Hypertension and interaction with MetS	[79,110]
	SHHR	Yes	Yes	Yes	Hyperfibrinogenemia, hypercoagulation	Hypertension, hyperlipidemia and their interactions with coagulation	[42,80,99]
Mice	Lep <sup>ob/ob</sup>	Yes	Yes	Yes	Less thrombosis	Hypertension, coagulation and their interaction with MetS	[82,83,87,89]
	LepR <sup>db/db</sup>	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>	Yes	Yes	Yes	ND	MetS and its interactions with hypertension	[92]
	Apob48 <sup>-/-</sup> -Lep <sup>ob/ob</sup> mice	Yes	Yes	Yes	ND	MetS, hyperlipidemia and their interactions with hypertension	[93,94]
	New Zealand obese mice	Yes	Yes	Yes	ND		



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 hyperlipidaemia 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.

## 6. 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 thromboses less than their controls. Leptin administration increased occlusion in these two mutant mice [90].

Leptin receptor-deficient mice ( $LepR^{db/db}$ ) do not have leptin receptors. As with  $Lep^{ob/ob}$  mice, the obese and insulin-resistant phenotype of  $LepR^{db/db}$  mice depends upon their genetic background. The metabolic profiles of  $LepR^{db/db}$  and  $Lep^{ob/ob}$  mice are nearly identical. Both models are obese, hyperinsulinaemic, hyperglycaemic (depending on the age and strain), have elevated total cholesterol levels [83] and less thrombosis following onset of vascular injury. The primary difference between the two models is that the  $LepR^{db/db}$  mice have dramatic elevations in circulating leptin concentrations that are



proportional to their degree of adiposity, whereas the Lep<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.

## 7. 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 hypercoagulable 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].

## 8. 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 pro-coagulant factors and relative fibrinolysis inhibition (Fig. 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.

## Acknowledgement

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



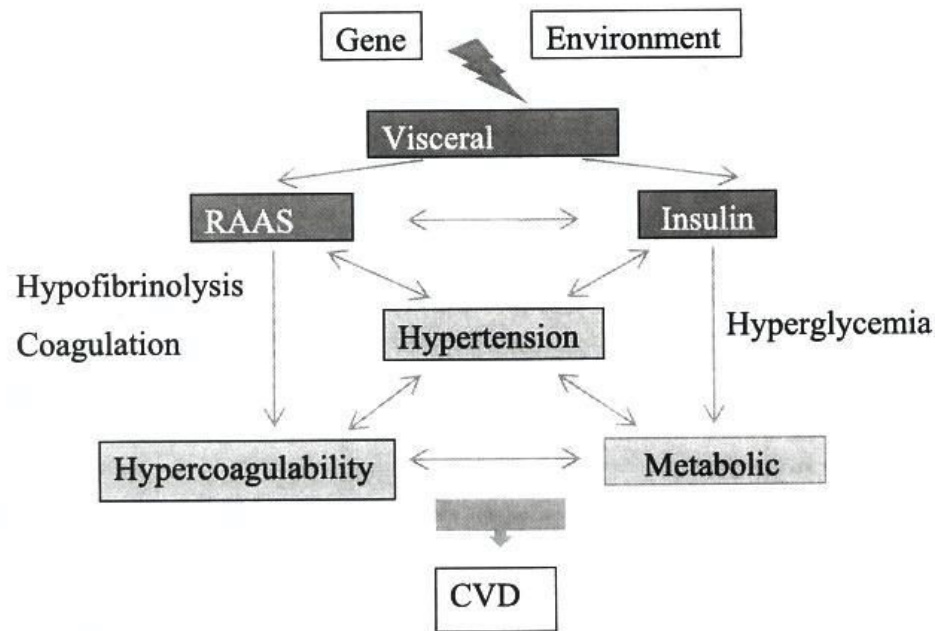


Fig. 2. Involvement of hypertension, hypercoagulability and metabolic syndrome in cardiovascular disease. CVD: cardiovascular disease; RAAS: renin angiotensin aldosterone system. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-2012-0688>.)

## 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), 3143–3421.
- [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), 727–735.
- [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), 379–387.
- [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), 1421–1426.
- [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), 1419–1424.
- [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), 865–872.
- [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), 1243–1252.
- [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), 1949–1953.
- [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), 251–255.
- [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), 70–76.



- [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–H1641.
- [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), 1229–1237.
- [17] P.A. Sarafidis and G.L. Bakris, Review: insulin and endothelin: an interplay contributing to hypertension development?, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92** (2007), 379–385.
- [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–E954.
- [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), 227–235.
- [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), 1752–1761.
- [21] C.K. Roberts, R.J. Barnard, R.K. Sindhu, M. Jurczak, A. Ehdaie and N.D. Vaziri, A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression, *J. Appl. Physiol.* **98** (2005), 203–210.
- [22] J.E. Hall, Pathophysiology of obesity hypertension, *Curr. Hypertens. Rep.* **2** (2000), 139–147.
- [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–H1575.
- [24] J.R. Sowers, Insulin resistance and hypertension, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286** (2004), H1597–H1602.
- [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), 941–952.
- [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), 1473–1478.
- [27] S. Engeli, R. Negrel and A.M. Sharma, Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin–angiotensin system, *Hypertension* **35** (2000), 1270–1277.
- [28] L.A. Cassis, J. Saye and M.J. Peach, Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA, *Hypertension* **11** (1988), 591–596.
- [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), 336–341.
- [30] U. Shenoy and L. Cassis, Characterization of renin activity in brown adipose tissue, *Am. J. Physiol.* **272** (1997), C989–C999.
- [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), 401–409.
- [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), 133–138.
- [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), 224–230.
- [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–E1077.
- [36] R. Lichnovska, S. Gwozdziwiczova, 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), 119–126.
- [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–e153.
- [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), 475–486.
- [39] F. Samad, M. Pandey and D.J. Loskutoff, Regulation of tissue factor gene expression in obesity, *Blood* **98** (2001), 3353–3358.
- [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), 139–142.
- [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), 191–198.
- [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), 2783–2789.
- [44] G.E. Sonnenberg, G.R. Krakower and A.H. Kissebah, A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome, *Obes. Res.* **12** (2004), 180–186.
- [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), 5377–5781.
- [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), 153–160.
- [47] P.J. Grant, Diabetes mellitus as a prothrombotic condition, *J. Intern. Med.* **262** (2007), 157–172.
- [48] C. Mineo, H. Deguchi, J.H. Griffin and P.W. Shaul, Endothelial and antithrombotic actions of HDL, *Circ. Res.* **98** (2006), 1352–1364.
- [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), 1378–1382.
- [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), 264–269.
- [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), 861–872.
- [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), 208–217.
- [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), 680–692.
- [54] M.C. Alessi and I. Juhan-Vague, PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26** (2006), 2200–2207.
- [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.* **129**(4) (2012), 499–501.
- [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), 1835–1841.
- [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), 700–701.
- [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), 1172–1179.
- [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), 417–422.
- [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), 1248–1255.
- [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), 1118–1125.
- [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), 107–117.
- [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), 23111–23118.
- [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), 1210–1219.
- [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), 2594–2604.
- [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), 844–851.



- [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), 18–19.
- [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), 143–152.
- [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), 364–370.
- [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), 107–109.
- [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), 2222–2226.
- [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), 1971–1976.
- [74] Y. Anini and P.L. Brubaker, Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion, *Diabetes* **52** (2003), 252–259.
- [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), 125–136.
- [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), 901–909.
- [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), 2299–2306.
- [78] S. Koletsky, Pathologic findings and laboratory data in a new strain of obese hypertensive rats, *Am. J. Pathol.* **80** (1975), 129–142.
- [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), 315–318.
- [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), 537–544.
- [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), 168–180.
- [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), 425–432.
- [83] A.J. Kennedy, K.L. Ellacott, V.L. King and A.H. Hasty, Mouse models of the metabolic syndrome, *Dis. Models Mech.* **3** (2010), 156–166.
- [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), 1232–1240.
- [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), 4140–4146.
- [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), 724–728.
- [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), 3483–3490.
- [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–H2479.
- [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), 1706–1709.
- [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–e122.
- [92] D.J. Lloyd, J. McCormick, J. Helmering, K.W. Kim, M. Wang, P. Fordstrom, S.A. Kaufman, R.A. Lindberg and M.M. Veniant, Generation and characterization of two novel mouse models exhibiting the phenotypes of the metabolic syndrome: Apob48-/-Lepob/ob mice devoid of ApoE or Ldlr, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **294** (2008), E496–E505.
- [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), 1384–1392.
- [95] M.A. Miller, C.R. Spillert, R. Ponnudurai, S. Bonthu and E.J. Lazaro, Are hypertensives hypercoagulable?, *J. Natl. Med. Assoc.* **87** (1995), 71–72.
- [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), 2442–2447.
- [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), 1226–1232.
- [98] A.A. Ajayi, H. Hercule, J. Cory, B.E. Hayes and A.O. Oyekan, Gender difference in vascular and platelet reactivity to thromboxane A(2)-mimetic U46619 and to endothelial dependent vasodilation in Zucker fatty (hypertensive, hyperinsulinemic) diabetic rats, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **59** (2003), 11–24.
- [99] H. Gomibuchi, M. Okazaki, S. Iwai, T. Kumai, S. Kobayashi and K. Oguchi, Development of hyperfibrinogenemia in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats: a potentially useful animal model as a complication of hypertension and hyperlipidemia, *Exp. Anim.* **56** (2007), 1–10.
- [100] L.A. Sechi, M. Novello, G. Colussi, A. Di Fabio, A. Chiuch, E. Nadalini, A. Casanova-Borca, A. Uzzau and C. Catena, Relationship of plasma renin with a prothrombotic state in hypertension: relevance for organ damage, *Am. J. Hypertens.* **21** (2008), 1347–1353.
- [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), 420–425.
- [102] M. Kaminska, A. Mogielnicki, A. Stankiewicz, K. Kramkowski, T. Domaniewski, W. Buczek and E. Chabielska, Angiotensin II via AT1 receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats, *J. Physiol. Pharmacol.* **56** (2005), 571–585.
- [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), 3867–3873.
- [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), 1509–1515.
- [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), 827–833.
- [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), 105–111.
- [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 fatty rat, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289** (2005), H845–H851.
- [110] S. Koletsky, Animal model: obese hypertensive rat, *Am. J. Pathol.* **81** (1975), 463–466.

## **Propriétés pro- et anti-coagulantes associées aux cellules musculaires lisses vasculaires.**

### **Pro- and Anti-coagulants properties of vascular smooth muscles cells.**

Jérémy Lagrange<sup>1,2\*</sup>, Karima Ait Aissa<sup>1,2\*</sup>, Denis Wahl<sup>1,2,3</sup>, Patrick Lacolley<sup>1,2</sup> et

Véronique Regnault<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U1116, Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

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

<sup>3</sup>CHU Nancy, Médecine Vasculaire, Nancy, France

\* : égale contribution.

Correspondance : Jérémy Lagrange, Inserm U1116, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel 03 83 68 34 70, Fax 03 83 68 36 39 ; mail : jeremy.lagrange@inserm.fr

### **Résumé**

La génération de thrombine nécessite la présence des facteurs de la coagulation et d'une surface de phospholipides procoagulants. Le fait que les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) apoptotiques et non-apoptotiques peuvent permettre la génération de thrombine suggèrent un lien entre ces cellules et l'hémostase. Historiquement, les cellules de la paroi vasculaire connues pour être très impliquées dans l'hémostase sont les cellules endothéliales (CE). Cependant les CMLV sont directement en contact avec le sang en cas de brèche vasculaire. De ce fait, bien que leur rôle premier réside dans le maintien du tonus vasculaire, la question se pose de leur implication dans les différentes étapes de l'hémostase. Cette question est d'autant plus pertinente que les CMLV, de manière constitutive, ou en réponse à une stimulation, synthétisent un large panel de molécules de la coagulation, certaines procoagulantes (facteur tissulaire, facteur II et V) d'autres anticoagulantes (inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, thrombomoduline, protéine C, récepteur endothélial de la protéine C). Des récepteurs cellulaires à la thrombine (protease activated receptors) ont été découverts à la surface des CMLV et les effets mitogènes de la thrombine via ces récepteurs sont bien décrits. Nous nous proposons ici de regrouper les différentes études qui ont été faites sur les CMLV en lien avec les molécules pro- et anticoagulantes et d'envisager l'impact potentiel de ces cellules sur la génération de thrombine, que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques.

Mots clés : cellules musculaires lisses vasculaires, coagulation, pulsatilité, athérosclérose, hypertension.

## **Abstract**

Thrombin generation is determined by the presence of coagulation factors and a procoagulant phospholipid surface. Vascular smooth muscle cells (VSMC) can support thrombin generation highlighting a potential role of these cells in hemostasis. Basically, the vascular wall cells known to be directly implicated in hemostasis are the endothelial cells. But, VSMC are in contact with blood in case of vascular injury. That is why, even if the first purpose of VSMC is to regulate vascular tone, we can emphasize that these cells could be an important and underestimated modulator of hemostasis processes. This question is even more interesting when we take into account that many clotting factors are synthesized by VSMC, some of which are procoagulant (tissue factor, factor II and V), and others anticoagulant (tissue factor pathway inhibitor, protein C, thrombomodulin, endothelial protein C receptor). However, since the discovery of thrombin cellular receptors (PARs) on VSMC, mainly the potential actions of coagulation factors on VSMC migration or secretion have been considered but not the potential implication of VSMC themselves in thrombin generation. In this review we will review studies that search out the links between VSMC and coagulation with emphasis on studies looking at the potential impact of VSMC on coagulation in normal and pathological conditions.

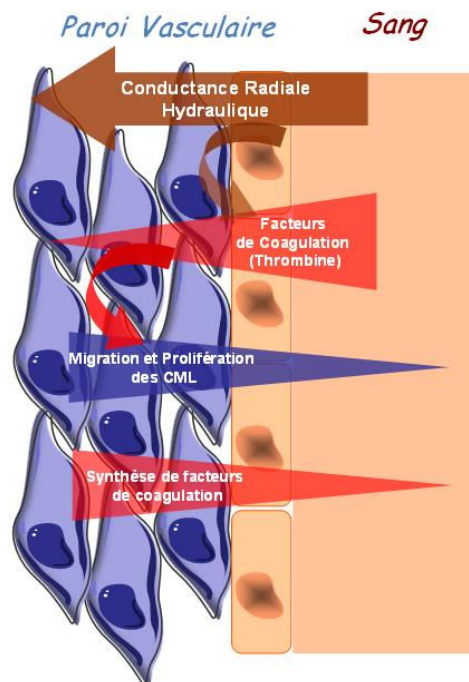
## **Introduction**

La fonction la plus connue des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) concerne la vasomotricité qui conditionne l'irrigation sanguine des organes. Sa régulation est assurée par le système nerveux autonome ainsi que par la production intrinsèque de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales [1]. En cas de brèche vasculaire, les CMLV exercent un effet de vasoconstriction et l'exposition du collagène présent au niveau du favorise l'activation et l'agrégation plaquettaire pour aboutir à une meilleure efficacité des thrombi plaquettaires et fibrino-cruoriques. De surcroît, les CMLV se trouvent alors au contact de sang et pourraient être directement impliquées dans l'hémostase. La synthèse de molécules procoagulantes par les CMLV suggère également que ces cellules pourraient de façon autonome générer de la thrombine au niveau pariétal. Cette thrombine pourra exercer des effets cellulaires ou des effets coagulants au sein de la paroi.

Depuis une quinzaine d'années et la découverte de récepteurs de type « protease-activated receptor » (PAR) à la surface des CMLV [2, 3], le rôle de la thrombine et des facteurs de la coagulation sur les CMLV a été mis en lumière. Ainsi, la thrombine régule de très nombreuses fonctions au niveau de ces cellules telles que la différenciation, la migration, l'inflammation, la synthèse d'ADN et l'expression de certains gènes [4-8]. Une des caractéristiques majeures de la thrombine est le côté pléiotropique de ses effets, à la fois dans le compartiment sanguin et dans le compartiment pariétal. Les déterminants de la génération de thrombine par les cellules vasculaires ainsi que les quantités générées ne sont pas connus et jouent probablement un rôle majeur dans les effets thrombotiques et cellulaires de la thrombine.

En raison de la conductance radiale hydraulique, la paroi artérielle est constamment soumise à la convection de molécules circulantes plasmatiques [9]. Par ce processus, les facteurs de coagulation pourraient se retrouver en contact direct avec les CMLV en absence de brèche vasculaire. Cette convection physiologique des peptides ou des macromolécules du plasma vers la paroi est la principale source de stimuli extrinsèques, qui, avec le temps, modifie le phénotype des CMLV (surcharge lipidique, hyperglycémie ou influence de zymogènes tels que les facteurs de coagulation) (Figure 1). En réponse à des changements de ces forces de convection liés à différentes situations physiologiques comme le vieillissement ou pathologiques comme l'hypertension, l'athérosclérose ou les anévrismes de l'aorte, les CMLV peuvent modifier leur phénotype par des voies de signalisation ligand / récepteur.

Nous allons ici faire une synthèse des travaux ayant étudié le rôle des facteurs de coagulation et la génération de thrombine au niveau des CMLV.



**Figure 1** : Transfert bidirectionnel des facteurs de coagulations entre la paroi artérielle et le sang

### Les cellules musculaires lisses vasculaires dans l'hémostase

Les CMLV représentent la composante cellulaire principale de la paroi vasculaire. Ce sont des cellules peu différenciées issues du mésoderme. Elles sont arrangées de façon concentrique. Elles sont généralement fusiformes et uninuclées (contrairement aux CM squelettiques qui sont plurinuclées) et mesurent de 2 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre pour une longueur très variable selon le tissu.

#### Synthèse des facteurs de coagulation par les CMLV

Leur proximité avec le sang, qui contient la majorité des facteurs de la coagulation, et la présence de collagène dans la média qui intervient dans l'agrégation plaquettaire, font que les CMLV peuvent être impliquées lors des processus hémostatiques car elles expriment un grand nombre de molécules et de récepteurs ayant un rôle clés dans la coagulation (Tableau I). En effet, les CMLV synthétisent notamment du facteur tissulaire (FT), que ce soit de



manière constitutive, ou en réponse à une stimulation [10, 11]. Ce facteur est exprimé par les CMLV mais à un niveau variable en fonction de la localisation du vaisseau dans l'arbre vasculaire [12]. Il a également été montré par divers études que le FT pouvait être produit suite à la stimulation des CMLV par les lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées [13]. D'autres études ont rapporté que les CMLV peuvent même exprimer certains facteurs de coagulation comme la prothrombine [14] et le facteur V (FV) [15]. Les CMLV possèdent également des propriétés anticoagulantes car elles expriment l'inhibiteur de la voie du FT 1 (TFPI 1) [12, 16-18]. Un autre système anticoagulant pourrait être actif à la surface des CMLV, c'est celui de la protéine C activée (PCa). En effet, le récepteur pour la protéine C (EPCR) [19] et la thrombomoduline (TM) [20] sont présents à la surface des CMLV. Ces deux molécules jouent un rôle crucial dans la conversion de la protéine C (PC) en PCa par la thrombine et peuvent être libérées sous forme soluble dans le plasma où elles contribuent à la régulation de la coagulation et de l'inflammation [21].

**Tableau I :** Les facteurs de coagulation synthétisés par les cellules musculaires lisses vasculaires

<b>Facteur de coagulation</b>	<b>Fonction</b>	<b>Type de synthèse</b>	<b>Références</b>
FT	Récepteur	Constitutive ou inductible sous l'action de facteurs de croissance (sérum, PDGF, EGF)	[11]
FII	Zymogène	Constitutive	[14]
FV	Procofacteur	Constitutive	[15]
TFPI 1	Inhibiteur	Inductible sous l'action de facteurs de croissance (sérum, PDGF, FGF)	[16-18]
TM	Récepteur	Inductible sous l'action de cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ )	[20]
EPCR	Récepteur	Constitutive	[19]

#### Génération de thrombine à la surface des CMLV

La première mise en évidence de la capacité des CMLV à permettre la conversion de prothrombine en thrombine, l'étape clé de la coagulation, remonte à la fin des années 1990. Cette démonstration a été faite par Flynn et coll [22] qui ont mesuré la thrombine générée à la surface de CMLV apoptotiques en l'absence de plaquettes. Celle-ci est inhibée par l'annexine

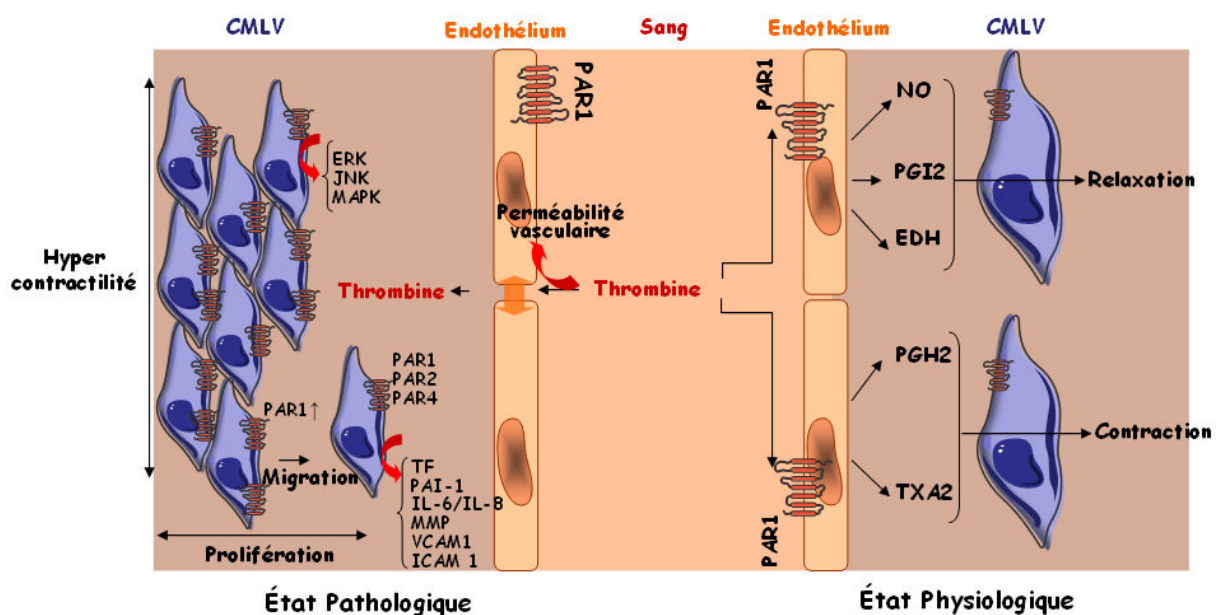
V, de manière concentration-dépendante, ce qui montre l'importance des phospholipides chargés négativement exposés à la face externe de ces cellules apoptotiques. Par la suite, Pathak et al [23] ont montré que la thrombine pouvait être générée à la surface de CMLV non apoptotiques et à la surface des sections artérielles de l'artère mammaire humaine, dépourvues d'adventice. Cette génération de thrombine est inhibée par un anticorps anti-F<sub>T</sub> et le pic de thrombine est dépendant de quantité de F<sub>T</sub> ajoutée au milieu réactionnel. Plus récemment, Campbell et al [24] ont comparé la génération de thrombine et la fibrine formée à la surface des CMLV humaines, de CE de cordon ombilical (HUVEC pour Human Umbilical Endothelial Cells) et de lignées de fibroblastes adhérents. Le pic de thrombine générée à la surface des fibroblastes et des CMLV est beaucoup plus important que celui mesuré à la surface des HUVEC. Les HUVEC traitées avec du TNF- $\alpha$  acquièrent une capacité à former un réseau de fibrine proche de celle des CMLV, ce qui souligne l'influence de l'inflammation sur le phénotype thrombotique de la paroi. Si la concentration en F<sub>T</sub> actif est un déterminant majeur de la quantité de thrombine générée à la surface de ces cellules, l'ensemble des mécanismes impliqués dans la génération-inhibition de la thrombine à la surface des CMLV reste à élucider.

Les liens qui unissent les CMLV à la coagulation sont à double sens. Un exemple de ces interactions est la mise en évidence d'une augmentation de la génération de thrombine F<sub>T</sub>-dépendante à la surface de CMLV aortiques en présence de faibles concentrations d' $\alpha$ -thrombine [25]. L'activation des récepteurs PAR3 et PAR4 des CMLV par la thrombine induit une augmentation d'expression du F<sub>T</sub> et de phosphatidylsérine sur la face externe des membranes.

#### Effets cellulaires de la thrombine

La molécule centrale de la coagulation sanguine, la thrombine, a aussi des effets sur plusieurs fonctions biologiques de la paroi vasculaire, comme la prolifération, la différenciation, la migration des CMLV ou des CE, la réponse inflammatoire, la production de la matrice extracellulaire (MEC), le développement vasculaire, l'athérogénèse et l'angiogénèse [26]. Vu et coll ont découvert le premier récepteur de la thrombine, appartenant à la famille des récepteurs PARs, PAR1 [27]. La thrombine, via ce récepteur, permet la vasoconstriction ou la vasodilatation de la paroi vasculaire en fonction des agonistes libérés par l'activation des CMLV (Figure 2). En pathologie, la thrombine peut agir comme un facteur de croissance participant à la régulation de la prolifération des CMLV dans le remodelage vasculaire. Ce remodelage intervient dans les processus d'athérosclérose, d'hypertension et de resténose. Les récepteurs PAR1, 2 et 4, présents à la surface des CMLV,

sont responsables des effets de la thrombine sur la migration [28], la prolifération et l'hypertrophie [29]. En réponse à des 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 [30]. Les voies de signalisation induites par l'activation des PAR impliquent les MAP kinases : ERK, JNK et p38 [31-33]. La thrombine joue également un rôle critique dans les processus d'inflammation [6]. La thrombine peut induire l'expression de facteurs inflammatoires tels que l'interleukine-6 (IL-6) [34] ou augmenter la sécrétion des métalloprotéinases (MMP) qui dégradent la MEC et accélèrent le remodelage vasculaire [35, 36] (Figure 2).



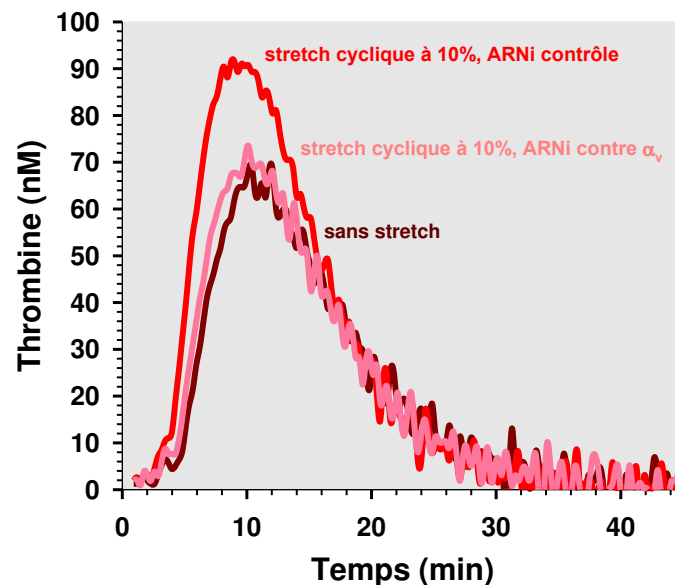
**Figure 2** : Effets cellulaires physiologiques et pathologiques de la thrombine

### Influence de la pression artérielle sur le phénotype des CMLV

Les CMLV, au même titre que les CE réagissent, à la pulsativité liée au flux sanguin et à la pression artérielle. Ainsi, Matsumoto et coll [37] ont montré en 1998 que les déformations appliquées aux CE diminuaient l'expression de TNF- $\alpha$  induite par le TF. De même, les CMLV semblent sensibles aux contraintes mécaniques que subissent les vaisseaux sanguins. Dès 1999, Redmond et coll [38] ont montré que la pression pulsée appliquée à des CMLV en co-culture avec des CE au niveau d'un capillaire soumis à un flux, induit une augmentation de l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA). Dans cette étude,

l'u-PA a un effet cellulaire sur la migration des CMLV. Redmond et coll ont également montré en 2005 que l'éthanol inhibe les effets de la pression pulsée sur la migration des CMLV en augmentant de 3 à 4 fois l'expression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), et en diminuant l'expression des MMP [39].

L'exposition des CMLV à des étirements cycliques constants résultant du débit sanguin pulsatile et de l'amincissement de la paroi pendant la systole déclenche des signaux intracellulaires par des «mécano-capteurs» comme les intégrines, les récepteurs tyrosine kinases et les canaux ioniques [40]. Il a été démontré que la mécanotransduction des signaux via les intégrines est responsable de la modulation du phénotype de CMLV et de leurs fonctions régulant ainsi la différenciation, la prolifération, l'apoptose, la migration et la réorganisation de la matrice MEC dans les CMLV. La mécanotransduction cellulaire induit une expression rapide et transitoire de molécules régulatrices telles que des facteurs de transcription, des molécules de signalisation, des facteurs de croissance et des protéines du cytosquelette [41-44]. Concernant les facteurs de coagulation, nous avons montré que l'application d'un stretch mécanique (10%, 1 Hertz) pendant 48 heures augmente la synthèse et la sécrétion du TFPI 1 par les CMLV *in vitro* [45]. Ainsi, les forces d'étirement cycliques pourraient moduler *in fine* la génération de thrombine à la surface des CMLV et l'apoptose de ces cellules [46]. *In vitro*, la génération de thrombine augmente avec le niveau des contraintes pulsatiles par un mécanisme impliquant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (figure 3)[47]



**Figure 3 :** Génération de thrombine à la surface de CMLV soumises ou non à 6 h de stretch cyclique (10%, 1 Hz) 72 h après transfection avec des ARN interférants contrôle ou ciblant la sous-unité  $\alpha_v$

## **Impact des CMLV sur les pathologies de la paroi artérielle**

La modification phénotypique des CMLV est impliquée très précocement dans des pathologies du vaisseau très répandues augmentant les risques d'événements thrombotiques telle que l'hypertension, l'athérosclérose ou le vieillissement accéléré [48]. Dans l'athérosclérose les CMLV ont un rôle important dans la constitution de la plaque puisqu'elles vont migrer de la média vers l'intima en adoptant un phénotype inflammatoire.

Le rôle des facteurs de coagulation et leur impact sur la migration et/ou l'inflammation ont été étudiés en pathologie. Ainsi le complexe FT/FVIIa est impliqué dans la migration via PAR 2 et dans la prolifération via la voie de phosphorylation ERK [49, 50]. Le FXIII lui serait impliqué dans l'adhésion des CMLV [51]. De son côté, le fibrinogène, qui est présent dans le noyau nécrotique, induit la synthèse de molécules proinflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  [52].

En ce qui concerne la rupture de la plaque d'athérosclérose et l'athérombose, un certain nombre d'éléments suggèrent que les CMLV pourraient être directement impliquées. En effet, l'état apoptotique des CMLV qui favorise leur capacité à servir de support cellulaire pour la génération de thrombine [22], peut être induit par la synthèse locale de TFPI [46]. Pour le FT, qui est présent au niveau de la plaque d'athérome, son activité augmente, et son expression est corrélée à la thrombogénicité des plaques [53]. Au niveau des CMLV, la présence de LDL augmente la production d'une forme inactive de FT qui peut être rendue active par du peroxyde d'hydrogène [54]. Un travail de 2009 sur des souris ApoE (-/-) a montré que le FT est augmenté au niveau des cellules de la plaque [55]. D'autre part, l'implication des CMLV dans les anévrismes de l'aorte ascendante a été démontrée. Dans cette pathologie, il existe une augmentation de la génération de thrombine *in vivo* qui est corrélée à la dilatation de l'aorte. La présence de thrombine à l'intérieur de la couche médiane de la paroi aortique suggère que les CMLV pourraient servir de support cellulaire pour sa formation [56].

Le Tableau II résume les principales données de la littérature sur les facteurs de coagulation, leurs effets au niveau du phénotype des CMLV et les événements thrombotiques.

**Tableau II :** Facteurs de la coagulation influençant les CMLV et répercussions sur l'hémostase

Facteur de coagulation	Modifications et voies d'action sur les CMLV	Répercussion sur l'hémostase	Réf
	Action via les récepteurs PARs sur :		
	Différenciation par RhoA et la myocardine	ND	
	Expression d'IL-6 et IL-8 via Akt, PKC et MAPK / Synthèse de proteoglycanes	Prothrombotique	
FII et FIIa	Augmentation de la taille des glycosaminoglycanes	Potentiellement pro-thrombotique par augmentation de l'incorporation de LDL et développement de la plaque d'athérome	[4-8]
	Synthèse d'ADN suite à l'expression de FGF-2 via PI3K-Akt-Fra-1	ND	
FT/FVII	Prolifération via activation de PAR2	ND	[49, 50]
TFPI	Apoptose par inhibition des voies JAK-2/STAT-3 et survivine	Potentiellement prothrombotique	[46]
FXIIIa/Fibrinogène	Migration des CMLV	ND	[51]
Fibrinogène, fibrine et D-dimères de fibrine	Induction de la synthèse d'IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS	Stimulation par des facteurs de croissance (sérum, PDGF, FGF)	[52]

**PARs** : Récepteurs activés par protéases ; **RhoA** : Famille A des gènes homologues de Ras ; **IL-6** : Interleukin 6 ; **IL-8** : Interleukine 8 ; **Akt** : Protéine kinase B ; **PKC** : Protéine kinase C ; **Fra-1** : Antigène 1 apparenté au fos ; **MAPK** : Protéine kinase à activité mitogène ; **PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase ; **FGF-2** : Facteur de croissance 2 des Fibroblastes ; **LDL** : Lipoprotéine de faible densité ; **JAK-2** : Kinase Janus 2 ; **STAT-3** : Transducteur de signal et activateur de transduction 3 ; **TNF- $\alpha$**  : Facteur nécrotique de tumeurs-  $\alpha$  ; **iNOS** : NO synthase inductible ; **ND** : Non défini

## Conclusion

L'interaction entre les CMLV et la génération de thrombine doit faire partie des processus reconnus comme très importants dans l'hémostase et les pathologies liées. Ces cellules synthétisent des molécules de la coagulation et sont capables, au même titre que les plaquettes, d'être, dans certaines circonstances, un support cellulaire pour la génération de thrombine. Leurs modifications phénotypiques précoces dans des situations pathologiques telles que l'athérosclérose augmentent leur potentiel prothrombotique par la synthèse de FT, ou des remaniements membranaires conduisant à l'exposition de phospholipides anioniques. Dans les années futures, il sera intéressant d'étudier les flux de convections existant entre le sang et la paroi vasculaire, et plus particulièrement la quantité de thrombine générée in situ qui va conditionner ses effets cellulaires ou procoagulants au sein de la paroi.

## Références

1. Husain, M. and J. Moss, *Endothelium-dependent vascular smooth muscle control*. J Clin Anesth, 1988. **1**(2): p. 135-45.
2. Bretschneider, E., et al., *Evidence for functionally active protease-activated receptor-3 (PAR-3) in human vascular smooth muscle cells*. Thromb Haemost, 2003. **90**(4): p. 704-9.
3. Schror, K., et al., *Thrombin receptors in vascular smooth muscle cells - function and regulation by vasodilatory prostaglandins*. Thromb Haemost, 2010. **103**(5): p. 884-90.
4. Cao, H., N. Dronadula, and G.N. Rao, *Thrombin induces expression of FGF-2 via activation of PI3K-Akt-Fra-1 signaling axis leading to DNA synthesis and motility in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(1): p. C172-82.
5. Wu, S.Q. and W.C. Aird, *Thrombin, TNF-alpha, and LPS exert overlapping but nonidentical effects on gene expression in endothelial cells and vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(2): p. H873-85.
6. Chung, S.W., et al., *Thrombin promotes proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cell*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(3): p. 748-54.
7. Ivey, M.E. and P.J. Little, *Thrombin regulates vascular smooth muscle cell proteoglycan synthesis via PAR-1 and multiple downstream signalling pathways*. Thromb Res, 2008. **123**(2): p. 288-97.
8. Martin, K., et al., *Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin*. Circ Res, 2009. **105**(3): p. 214-8.
9. Michel, J.B., et al., *Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(6): p. 1259-68.
10. Osterud, B. and E. Bjorklid, *Sources of tissue factor*. Semin Thromb Hemost, 2006. **32**(1): p. 11-23.
11. Taubman, M.B., et al., *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, 1993. **91**(2): p. 547-52.

12. Payeli, S.K., et al., *Prothrombotic gene expression profile in vascular smooth muscle cells of human saphenous vein, but not internal mammary artery*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(4): p. 705-10.
13. Penn, M.S., et al., *Smooth muscle cell surface tissue factor pathway activation by oxidized low-density lipoprotein requires cellular lipid peroxidation*. *Blood*, 2000. **96**(9): p. 3056-63.
14. McBane, R.D., 2nd, et al., *Tissue prothrombin. Universal distribution in smooth muscle*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(11): p. 2430-6.
15. Rodgers, G.M., *Vascular smooth muscle cells synthesize, secrete and express coagulation factor V*. *Biochim Biophys Acta*, 1988. **968**(1): p. 17-23.
16. Pendurthi, U.R., et al., *Regulation of tissue factor pathway inhibitor expression in smooth muscle cells*. *Blood*, 1999. **94**(2): p. 579-86.
17. Caplice, N.M., et al., *Expression of tissue factor pathway inhibitor in vascular smooth muscle cells and its regulation by growth factors*. *Circ Res*, 1998. **83**(12): p. 1264-70.
18. Bajaj, M.S., et al., *Synthesis and expression of tissue factor pathway inhibitor by serum-stimulated fibroblasts, vascular smooth muscle cells and cardiac myocytes*. *Thromb Haemost*, 1999. **82**(6): p. 1663-72.
19. Bretschneider, E., et al., *Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor*. *Circ Res*, 2007. **100**(2): p. 255-62.
20. Soff, G.A., R.W. Jackman, and R.D. Rosenberg, *Expression of thrombomodulin by smooth muscle cells in culture: different effects of tumor necrosis factor and cyclic adenosine monophosphate on thrombomodulin expression by endothelial cells and smooth muscle cells in culture*. *Blood*, 1991. **77**(3): p. 515-8.
21. Gandrille, S., *Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis*. *Haematologica*, 2008. **93**(6): p. 812-6.
22. Flynn, P.D., et al., *Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells*. *Blood*, 1997. **89**(12): p. 4378-84.
23. Pathak, A., et al., *Thrombin generation in vascular tissue*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(1): p. 60-7.
24. Campbell, R.A., et al., *Contributions of extravascular and intravascular cells to fibrin network formation, structure, and stability*. *Blood*, 2009. **114**(23): p. 4886-96.
25. Vidwan, P., et al., *Activation of protease-activated receptors 3 and 4 accelerates tissue factor-induced thrombin generation on the surface of vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(12): p. 2587-96.
26. Patterson, C., et al., *New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology*. *Circ Res*, 2001. **88**(10): p. 987-97.
27. Vu, T.K., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. *Cell*, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
28. McNamara, C.A., et al., *Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(1): p. 94-8.
29. Borissoff, J.I., et al., *Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze?* *Cardiovasc Res*, 2009. **82**(3): p. 392-403.
30. Nguyen, K.T., et al., *Cyclic strain increases protease-activated receptor-1 expression in vascular smooth muscle cells*. *Hypertension*, 2001. **38**(5): p. 1038-43.
31. Rao, G.N., P. Delafontaine, and M.S. Runge, *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*, 1995. **270**(46): p. 27871-5.
32. Rao, G.N. and M.S. Runge, *Cyclic AMP inhibition of thrombin-induced growth in vascular smooth muscle cells correlates with decreased JNK1 activity and c-Jun expression*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(34): p. 20805-10.
33. Kanda, Y., et al., *Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway*. *Br J Pharmacol*, 2001. **132**(8): p. 1657-64.



34. Tokunou, T., et al., *Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(11): p. 1759-63.
35. Zucker, S., et al., *Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(40): p. 23730-8.
36. Galis, Z.S., et al., *Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(3): p. 483-9.
37. Matsumoto, Y., et al., *Fluid shear stress attenuates tumor necrosis factor-alpha-induced tissue factor expression in cultured human endothelial cells*. *Blood*, 1998. **91**(11): p. 4164-72.
38. Redmond, E.M., et al., *Effect of pulse pressure on vascular smooth muscle cell migration: the role of urokinase and matrix metalloproteinase*. *Thromb Haemost*, 1999. **81**(2): p. 293-300.
39. Cullen, J.P., et al., *Ethanol inhibits pulse pressure-induced vascular smooth muscle cell migration by differentially modulating plasminogen activator inhibitor type 1, matrix metalloproteinase-2 and -9*. *Thromb Haemost*, 2005. **94**(3): p. 639-45.
40. Haga, J.H., Y.S. Li, and S. Chien, *Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells*. *J Biomech*, 2007. **40**(5): p. 947-60.
41. Chapman, G.B., et al., *Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(3): p. H748-54.
42. Cheng, J., et al., *Mechanical stretch inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells by up-regulating integrin alphavbeta3 and stabilization of PINCH-1*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(47): p. 34268-75.
43. Albinsson, S. and P. Hellstrand, *Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **293**(2): p. C772-82.
44. Qu, M.J., et al., *Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain*. *J Vasc Res*, 2007. **44**(5): p. 345-53.
45. Regnault, V., et al., *Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(5): p. 1226-32.
46. Fu, Y., et al., *Adenovirus-mediated tissue factor pathway inhibitor gene transfer induces apoptosis by blocking the phosphorylation of JAK-2/STAT-3 pathway in vascular smooth muscle cells*. *Cell Signal*, 2012. **24**(10): p. 1909-17.
47. Mao, X., et al., *Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin alphavbeta3 pathway*. *Cardiovasc Res*, 2012.
48. Lacolley, P., et al., *The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles*. *Cardiovasc Res*, 2012. **95**(2): p. 194-204.
49. Cirillo, P., et al., *Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation*. *Circulation*, 2004. **109**(23): p. 2911-6.
50. Marutsuka, K., et al., *Protease-activated receptor 2 (PAR2) mediates vascular smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex*. *Thromb Res*, 2002. **107**(5): p. 271-6.
51. Naito, M., et al., *Effect of crosslinking by factor XIIIa on the migration of vascular smooth muscle cells into fibrin gels*. *Thromb Res*, 1998. **90**(3): p. 111-6.
52. Lu, P.P., et al., *Pro-inflammatory effect of fibrinogen and FDP on vascular smooth muscle cells by IL-6, TNF-alpha and iNOS*. *Life Sci*, 2011. **88**(19-20): p. 839-45.
53. Kato, K., et al., *Enhanced expression of tissue factor activity in the atherosclerotic aortas of cholesterol-fed rabbits*. *Thromb Res*, 1996. **82**(4): p. 335-47.
54. Penn, M.S., et al., *LDL increases inactive tissue factor on vascular smooth muscle cell surfaces: hydrogen peroxide activates latent cell surface tissue factor*. *Circulation*, 1999. **99**(13): p. 1753-9.

55. Li, J., et al., *Expression and location of intracellular tissue factor in atherosclerosis stable plaque of ApoE(-/-) mice*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009. **29**(4): p. 457-61.
56. Touat, Z., et al., *Dilation-dependent activation of platelets and prothrombin in human thoracic ascending aortic aneurysm*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 940-6.

## RESUME

L'allongement de l'espérance de vie a fait de l'insuffisance cardiaque (IC) l'un des problèmes majeurs de santé publique. Le syndrome métabolique (SMet) et l'hypertension sont deux facteurs parmi les plus importants conduisant à l'IC.

Les modifications qui interviennent au niveau structural et cellulaire de la paroi artérielle dans le SMet, l'hypertension et l'IC pourraient entraîner des anomalies de l'hémostase qui aggravent ces tableaux cliniques. Nous avons montré au cours de ce travail les modifications du phénotype de l'hémostase dans différents modèles animaux de pathologies impliquées dans la mise en place de l'IC.

L'altération de l'hémostase précède les modifications fonctionnelles de la paroi et pourrait favoriser le développement de l'IC chez le rat Zucker. Le modèle de rat spontanément hypertendu SHR présente une hypercoagulabilité de la paroi via les cellules musculaires lisses. Ces résultats ne permettent pas d'impliquer uniquement l'hypertension artérielle dans l'hypercoagulabilité plasmatique trouvée chez le rat Zucker. L'activation du récepteur à l'aldostérone au niveau endothélial chez la souris induit un phénotype antithrombotique provoqué par une augmentation de la réactivité du système anticoagulant de la protéine C, via son récepteur, l'EPCR. L'étude d'une cohorte de patients insuffisants cardiaques a permis de distinguer des paramètres de fonction cardiaque et de rigidité artérielle. Cette caractérisation est indispensable pour comprendre les mécanismes des événements thrombotiques associés à l'IC.

La conclusion de ce travail est que les pathologies pouvant conduire à la mise en place d'une IC modifient l'hémostase vers un état d'hypercoagulabilité qui fait intervenir la paroi artérielle.

**Mots clés :** paroi artérielle, génération de thrombine, hémostase, récepteur minéralocorticoïde, insuffisance cardiaque.

## ABSTRACT

Increasing life span has made heart failure (HF) a major issue for public health. The metabolic syndrome (MetS) and hypertension are two important factors which can lead to HF.

Structural and cellular modification occurring in the arterial wall in the MetS, hypertension and HF may provoke hemostasis alterations that can worsen the clinical situation. We have shown in this work, hemostasis modifications in animal models of pathologies implicated in HF development.

Hemostasis alterations were shown to precede functional modifications of the arterial wall and could favor HF development in Zucker rats. Spontaneously hypertensive rats showed an arterial wall hypercoagulability via smooth muscle cells. These results don't permit the implication of hypertension in the hypercoagulable state found in the Zucker rat. A mouse model with aldosterone receptor activation in the endothelium lead to a hypocoagulable state by increasing the protein C anticoagulant system via his receptor, the EPCR. Studying a human HF patient cohort permitted the measurement of cardiac function and of arterial stiffness parameters. This characterization is important to understand thrombosis events associated with HF in humans.

The general conclusion of this work is that, in pathologies leading to HF, modification of hemostasis to a procoagulable state, implicates the arterial wall.

**Key Words:** arterial wall, thrombin generation, hemostasis, mineralocorticoid receptor, heart failure.