



HAL
open science

Caractérisation du phénotype hypercoagulable et de ses déterminants dans l'insuffisance cardiaque aiguë

Batric Popovic

► **To cite this version:**

Batric Popovic. Caractérisation du phénotype hypercoagulable et de ses déterminants dans l'insuffisance cardiaque aiguë. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0336 . tel-03247840

HAL Id: tel-03247840

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03247840>

Submitted on 13 Jan 2022

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



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

Batric POPOVIC

**Caractérisation du phénotype hypercoagulable et de ses
déterminants dans l'insuffisance cardiaque aiguë**

Date de soutenance : 12 avril 2016

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme Florence PINET « Directeur de recherche, INSERM U1167, Lille »

Mr Philippe NGUYEN « PU-PH, EA 3801, REIMS »

Examineurs:

Mr Faiez Zannad « PU-PH, INSERM U1116, Nancy » directeur de thèse

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

Mr Patrick LACOLLEY « Directeur de recherche, INSERM U1116, Nancy »

INSERM 1116 « défaillance cardiovasculaire aiguë et chronique »,
Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, Université de Lorraine

Remerciements

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

Mr le Pr **Faiez Zannad**, mon directeur de thèse, de m'avoir confié ce travail de thèse.

Son aide scientifique et ses conseils et sa grande disponibilité pour répondre à mes questions m'ont été précieux.

Mme le Dr **Véronique REGNAULT**, mon co-directeur de thèse, de m'avoir confié ce travail de thèse

Son aide scientifique, ses conseils, dans toutes les étapes de cette thèse et sa grande disponibilité pour répondre à mes questions m'ont été d'un très grand soutien. J'ai pu apprécier sa grande capacité de travail, sa bonne humeur et son dynamisme. J'espère que nous pourrons continuer à collaborer dans le futur.

Je remercie le Dr **Patrick LACOLLEY**, directeur de l'unité où s'est déroulé ce travail de thèse de m'avoir fait l'honneur de m'accueillir dans son unité.

Je lui suis reconnaissant pour son implication dans ce travail. J'ai pu apprécier sa rigueur et son dynamisme.

Je remercie Mme le **Dr Florence Pinet** pour l'honneur qu'il me fait d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie Mr le Dr **Philippe Nguyen** pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et de l'expression de tous mes remerciements.

Je tiens à remercier **Mr le Pr Etienne Aliot et Mr le Pr Nicolas Sadoul** de m'avoir permis de réaliser ce travail et de leur soutien.

Je remercie également **l'ensemble de mes collègues** du département de cardiologie du CHU Nancy pour leur soutien

Je remercie le **Dr Renaud Fay** pour son aide si précieuse et de sa patience

Je remercie le **Dr Louis Huguet** pour son aide précieuse dans ce travail, le **Dr Jérémy Lagrange** pour tous les conseils apportés au début de ce travail.

Je tiens à remercier **Mme LAKOMY Cécile** pour toute l'aide apportée à ce travail

Je tiens à remercier également l'ensemble des personnes que j'ai pu côtoyer au sein de l'unité INSERM 1116.

Je dédie ce travail à **Sacha et Viktor**

et à mon épouse **Auréli** pour son soutien de tous les instants : rien n'aurait été possible sans son aide

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	10
II. POSITION DU SUJET	12
II.1. Insuffisance cardiaque et évènements thrombotiques cliniques	12
II.1.1 les évènements coronariens aigus	12
II.1.2. la maladie thromboembolique	14
II.1.3 Les évènements cérébrovasculaires	15
II.1.4. Insuffisance cardiaque et traitement antithrombotique	17
II.1.4.1. Traitement anticoagulant et insuffisance cardiaque chronique	17
II.1.4.2. un sous-groupe à risque : syndrome coronaire aigu et insuffisance cardiaque	20
II.1.4.2.1. Double anti-agrégation plaquettaire et insuffisance cardiaque	20
II.1.4.2.2 Bivalirudine et insuffisance cardiaque	20
II.1.4.3. Nouveaux anticoagulants oraux et insuffisance cardiaque.	21
II.2. Hypercoagulabilité et Insuffisance cardiaque : physiopathologie	26
II.2.1. Hypercoagulabilité et dysfonction endothéliale	29
II.2.2. Hypercoagulabilité et activation plaquettaire	30
II.2.3. Hypercoagulabilité et inflammation	32
II.2.4 Hypercoagulabilité et insuffisance cardiaque : étude de nouveaux mécanismes	37
II.2.4.1.1 les différentes composantes de la voie de la protéine C	37
II.2.4.1.2 Mécanismes d'action de la PCa	44
II.2.4.2 Les microparticules	56
II.2.4.2.1. Introduction	56
II.2.4.2.2. Propriétés des microparticules	60
II.2.4.2.3 Etude des microparticules dans l'insuffisance cardiaque	65
III) HYPOTHESES ET OBJECTIFS	68
IV. PATIENTS ET METHODES	70
IV.1. Sélection des patients	70
IV.2. Méthodes	72
IV.2.1. Recueil des échantillons biologiques	72
IV.2.2. la thrombinographie	73
IV.2.3. les microparticules	76
IV.2.4. Les marqueurs solubles endothéliaux.	80
V. ANALYSE STATISTIQUE	82

	4
VI RESULTATS	83
VII DISCUSSION	99
VIII LIMITES DE L'ETUDE	105
IX CONCLUSION ET PERSPECTIVES	106
X. REFERENCES	108
XI PUBLICATIONS	143

Index des tableaux et des figures

Tableau 1 Etudes randomisées portant sur le traitement antithrombotique dans l'insuffisance cardiaque	19
Tableau 2 Nouveaux anticoagulants oraux et insuffisance cardiaque	23
Tableau 3 Paramètres d'hypercoagulabilité dans l'insuffisance cardiaque aiguë	28
Tableau 4 Caractéristiques de la population.....	84
Tableau 5 Les marqueurs circulants d'activation endothéliale	88
Tableau 6 Les microparticules procoagulantes augmentent dans l'insuffisance cardiaque aiguë	92
Tableau 7 L'insuffisance cardiaque aiguë augmente la génération de thrombine et altère la sensibilité à la PCa	97
Figure 1 Les cibles thérapeutiques des traitements antithrombotiques dans l'insuffisance cardiaque .	25
Figure 2 Différents mécanismes conduisant à l'hypercoagulabilité dans l'insuffisance cardiaque.....	27
Figure 3 Représentation schématique de l'activation de la protéine C sur les surfaces membranaires	39
Figure 4 Structure moléculaire de la thrombomoduline	40
Figure 5 Rôle régulateur de la protéine C dans l'hémostase.....	44
Figure 6 Activation du PAR-1 par la protéine C activée.....	48
Figure 7 Les différentes composantes de la voie de la protéine C	49
Figure 8 Différentes situations conduisant à une résistance à la protéine C	53
Figure 9 Aspects de microparticules en microscopie électronique à partir de mégacaryocytes murins	57
Figure 10 Mécanismes impliqués dans la vésiculation membranaire	58
Figure 11 Différences dans l'expression antigénique des microparticules	60
Figure 12 Représentation schématique du rôle des MPs dans le développement du thrombus	62

Figure 13 Représentation schématique du panel de récepteurs et enzymes exprimés à la surface des microparticules	65
Figure 14 Schéma général de l'étude	72
Figure 15 Paramètres de génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes	76
Figure 16 Exemple de cytogrammes obtenus chez un patient insuffisant cardiaque	79
Figure 17 Evaluation de l'agrégation plaquettaire dans les différents groupes étudiés	86
Figure 18 Nombre et répartition des microparticules en fonction de leur origine cellulaire et de leur marquage	93
Figure 19 L'insuffisance cardiaque aigue augmente la génération de thrombine et altère la sensibilité à la PCa	98

Abréviations

ADP : adenosine diphosphate

Ann V : annexine V

AVC : accident vasculaire cérébral

AVK : anti vitamine K

BNP : brain natriuretic peptid

Ca : calcium

C4BP : C4 binding protein

COX-2 : cyclooxygénase-2

CRP : protéine C réactive

ECE-1 : endothelin-converting enzyme

EPCR : récepteur endothélial à la protéine C

ESC : société européenne de cardiologie

ETP : potentiel thrombinique endogène

FACS: fluorescence tri cellulaire

FEVG : fraction d'éjection ventriculaire gauche

FPA: fibrinopeptide

Gla : carboxyglutamique

HR: hazard ratio

IC: intervalle de confiance

ICAM : intercellular adhesion molecules

IDM : infarctus du myocarde

IL-1 : interleukine-1

INR : International Normalized Ratio

MAP : mitogen activated protein

MCP-1 : monocytes chemoattractant protein-1

MPs : microparticules

NACO : nouveaux anticoagulants oraux

NF-kB : nuclear factor-kappa B

NO : oxyde nitrique

NYHA : New York Heart Association

OC : contraceptif oral

PAF 4 : platelet factor 4

PAI-1: plasminogen activator inhibitor 1

PC : protéine C

PCa : protéine C activée

PCI inhibiteur de la protéine C

PCRha : PCa recombinante humaine

PDP : plasma déplété en plaquettes

PE : phosphatidyléthanolamine

PPP : plasma pauvre en plaquettes

PRP : plasma riche en plaquettes

PS : protéine S

PSer : phosphatidylsérine

PT : prothrombine

RR : risque relatif

RANTES : regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted

ROCK-1 : Rho activated kinase

RPCa : résistance à la protéine C activée

RR : risque relatif

sEPCR : récepteur endothélial soluble à la protéine C

S1P1 : sphingosine-1-phosphate receptor 1

SNS : système nerveux sympathique,

SRAA : système rénine angiotensine aldosterone

TAT : thrombine-antithrombine III

TFPI : tissue factor pathway inhibitor

TG: thromboglobuline

TM : thrombomoduline

TNF α : tumor necrosis factor

t-PA : tissue-type plasminogen activator

VCAM : vascular cell adhesion molecules

VTDVG: volume télédiastolique du ventricule gauche

VTSVG: volume télésystolique du ventricule gauche

vWF : facteur de von Willebrand

u-PA: urokinase

u-PAR : récepteur à l'urokinase

I. INTRODUCTION

L'insuffisance cardiaque est une affection grave qui touche approximativement 1 à 2% de la population adulte des pays développés avec une prévalence augmentant à plus de 10% parmi les personnes de 70 ans et plus.¹ Cette prévalence élevée s'accompagne d'une augmentation du nombre d'hospitalisations pour une insuffisance cardiaque aiguë. Il s'agit d'un syndrome se définissant par l'apparition rapide ou progressive de signes cliniques ou de symptômes d'insuffisance cardiaque. Elle nécessite dans la majorité des cas une hospitalisation pour une prise en charge thérapeutique urgente. Malgré une grande hétérogénéité clinique et physiopathologique, la congestion pulmonaire liée à une augmentation des pressions de remplissage avec ou sans baisse du débit cardiaque représente une condition constante dans cette affection. L'insuffisance cardiaque aiguë signe, dans la plupart des cas, une déstabilisation de l'état clinique de patients présentant une insuffisance cardiaque chronique mais elle peut également représenter le tableau inaugural de la maladie. Chez les patients avec une insuffisance cardiaque préexistante, il existe souvent un facteur déclenchant ou un facteur favorisant comme par exemple la survenue d'une arythmie cardiaque, d'une ischémie myocardique, une hypertension artérielle sévère chez les patients à fonction ventriculaire systolique préservée ou l'arrêt d'un traitement diurétique chez les patients avec une dysfonction ventriculaire gauche.

Malgré le bénéfice apporté par les thérapeutiques récentes incluant les modulateurs neurohormonaux, le pronostic des patients présentant une insuffisance cardiaque aigue reste sombre avec un taux de ré hospitalisation de 50% à 6 mois et un taux de mortalité atteignant 30% à un an.^{2 3} L'identification d'autres mécanismes physiopathologiques est donc nécessaire afin de réduire la morbi mortalité de ces patients et améliorer leur qualité de vie. Ainsi, les

facteurs majeurs contribuant à l'apparition ou à l'aggravation de l'insuffisance cardiaque aiguë sont l'inflammation et l'apoptose des cardiomyocytes. D'autre part, il est bien établi qu'apoptose, inflammation et hypercoagulabilité sont étroitement liées.

La thrombose pourrait donc être une des cibles d'intérêt en raison de la fréquence élevée des événements thrombotiques chez ces patients qui concernent jusqu'à 30% d'entre eux et représentent souvent la cause de décès des patients ⁴.

Cette hypercoagulabilité a été étudiée, jusqu'à présent, essentiellement dans l'insuffisance cardiaque chronique, que ce soit sur le plan biologique ou thérapeutique avec l'évaluation de l'efficacité des traitements anticoagulants, avec pour ce dernier point des résultats assez décevants.

Nous avons fait le choix, dans notre travail, d'étudier l'état de coagulabilité dans le cadre de l'insuffisance cardiaque aiguë en considérant que c'est dans ce cadre-là que les différentes composantes physiopathologiques de l'insuffisance cardiaque que sont l'apoptose, l'inflammation et l'hypercoagulabilité sont les plus exacerbées. Une des originalités de notre travail est d'évaluer la coagulation par une méthode intégrative représentée par la thrombinographie qui permet l'étude des systèmes anticoagulants dont l'action est prépondérante après la phase de formation du caillot

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'état de coagulabilité des patients hospitalisés pour une décompensation cardiaque aiguë en le comparant à celui d'un groupe contrôle, de suivre les variations de cet état de coagulabilité au cours de la prise en charge et d'en analyser les déterminants.

II. POSITION DU SUJET

II.1. Insuffisance cardiaque et évènements thrombotiques cliniques

Différentes études ont montré que l'évolution de l'insuffisance cardiaque, à la suite d'un épisode de décompensation aigue ou non, est parfois marquée par la survenue d'évènements ischémiques cliniques. Le tableau clinique de ces évènements thrombotiques peut parfois être évident mais nombre de ces évènements ischémiques passent inaperçus car leurs symptômes s'intègrent dans le tableau clinique général du patient ce qui rend leur incidence difficile à évaluer. Toutefois, qu'ils soient cliniquement décelables ou non, ces évènements ischémiques participent de manière substantielle à la morbidité de ces patients. Si l'estimation de l'incidence des évènements thrombotiques dans l'insuffisance cardiaque reste difficile car influencée par les co morbidités associées, il faut néanmoins citer trois principaux évènements thrombotiques cliniques marquant l'évolution de cette affection : le syndrome coronaire aigu, l'accident cérébrovasculaire et les évènements veineux thromboemboliques.

II.1.1 les évènements coronariens aigus

- Infarctus du myocarde (IDM) de novo ou ré infarctus

La plupart des patients présentant une nécrose myocardique aigue liée à une thrombose coronaire présente également une autre lésion coronaire et cette atteinte coronaire multiple est associée à un plus haut risque de ré-infarctus. Dans la plupart des études cliniques menées sur des patients insuffisants cardiaques, le taux annuel d'infarctus et de ré infarctus dans cette

population est estimé entre 2 et 4%⁵⁻⁸. Néanmoins, un certain nombre d'infarctus de petite taille dans cette population passent inaperçus dans le tableau clinique initial, les causes du décès restant imprécises, souvent attribuées à une probable arythmie ventriculaire.

- Mort subite :

La prévalence de la mort subite est de 6 à 9 fois supérieure chez les patients insuffisants cardiaques par rapport au reste de la population, elle représente entre 20% et 60% des décès selon la sévérité de la dysfonction ventriculaire gauche⁹.

Dans l'étude autopsique de Uretsky et coll réalisée sur des cas de mort subite, la prévalence de signes en faveur d'un événement coronarien aigu est de 32% chez les patients présentant une coronaropathie chronique connue¹⁰. Même en l'absence d'une cardiopathie ischémique chronique, l'incidence des événements coronariens aigus n'est pas négligeable, elle est de près de 10% chez les patients insuffisants cardiaques¹⁰.

- Ascension des marqueurs sériques de nécrose

L'ascension des marqueurs sériques de nécrose comme la troponine est bien documentée dans l'insuffisance cardiaque aigue. Selon Parissis et coll, la troponine T ultrasensible représente un réel facteur pronostic péjoratif de ce tableau clinique¹¹. Si cette libération de troponines peut être due à des mécanismes non thrombotiques, des phénomènes de micro thromboses au niveau coronaire peuvent expliquer sa présence^{12,13}.

II.1.2. la maladie thromboembolique

La maladie veineuse thromboembolique joue un rôle important dans le devenir des patients insuffisants cardiaques et son diagnostic est souvent sous-estimé. En effet, une embolie pulmonaire survient chez près d'un quart des patients hospitalisés pour insuffisance cardiaque aiguë en l'absence de traitement anticoagulant préventif¹⁴. Un patient insuffisant cardiaque sur dix développe une maladie veineuse thromboembolique en unité de soins intensifs malgré la prescription d'une thromboprophylaxie, un taux supérieur à celui attendu chez un patient alité en dehors d'un contexte de décompensation cardiaque.¹⁴ Ce taux d'événements veineux thromboemboliques chez les patients insuffisants cardiaques augmente à la fois avec la sévérité de la dysfonction ventriculaire gauche (une fraction d'éjection ventriculaire gauche FEVG < 20% augmente de 38 fois le risque de thrombose veineuse profonde) et avec celle du tableau clinique de l'insuffisance cardiaque (en cas de dyspnée de stade IV de la classification NYHA, l'incidence de la thrombose veineuse profonde est de 22%)¹⁵.

Dans l'étude Magellan, Mebazaa et coll ont récemment confirmé le lien entre ce risque veineux thromboembolique et la sévérité du tableau clinique de l'insuffisance cardiaque.¹⁶ Leur étude montre, après analyse multivariée, que la concentration de NT-proBNP est significativement associée au risque veineux thromboembolique jusqu'à J10 et le taux de D-dimères jusqu'à J35 (p=0.005). Les auteurs suggèrent que le taux de NT-proBNP pourrait être utile pour évaluer le risque à court terme alors que le taux de D dimères pourrait correspondre au risque à moyen terme. Une analyse prospective a montré que l'embolie pulmonaire est la cause principale de décès chez les patients insuffisants cardiaques dans 3 à 10% des cas. Les analyses autopsiques chez les patients insuffisants cardiaques montrent même une incidence d'embolie pulmonaire de 32%¹⁷ D'autre part, l'insuffisance cardiaque est-elle même considérée comme un facteur pronostique indépendant de décès chez les patients présentant

une thrombose veineuse profonde. Dans l'étude Worcester Venous Thromboembolism Study menée sur des patients présentant une thrombose veineuse profonde, 17.5 % des patients inclus présentaient des antécédents d'insuffisance cardiaque¹⁸ et la présence d'une insuffisance cardiaque chez les patients est liée à un risque multiplié par 3 de décès intra hospitalier. Ainsi, les recommandations de la société européenne de cardiologie concernant l'insuffisance cardiaque présentent la maladie veineuse thromboembolique comme un facteur à la fois à l'origine de la décompensation cardiaque aiguë et un facteur aggravant du tableau clinique initial.¹⁹

II.1.3 Les événements cérébrovasculaires

La prévalence des accidents vasculaires cérébraux (AVC) semble également plus élevée chez les patients insuffisants cardiaques. Cette prévalence varie très largement dans la littérature en fonction du type d'étude. Le risque d'AVC est multiplié de deux à trois fois chez les patients insuffisants cardiaques²⁰. Dans les 30 jours qui suivent le diagnostic d'insuffisance cardiaque, ce risque est multiplié par 17 selon Witt et al par rapport à la population générale²¹.

L'association étroite entre AVC et insuffisance cardiaque est prise en compte par exemple dans le score de risque embolique des patients en fibrillation atriale : le CHA₂DS₂ VASc. Il s'agit d'un score permettant d'estimer le risque d'embolie artérielle lors d'une fibrillation atriale sans maladie valvulaire mitrale et permet d'aider à la décision de la mise en route d'un traitement anticoagulant ou non. Ce score inclut une série de facteurs majeurs de survenue d'un AVC, dont l'insuffisance cardiaque représentée par la lettre C²²

L'incidence des AVC chez les patients insuffisants cardiaques est également corrélée à la gravité du tableau clinique et à la dysfonction ventriculaire gauche. Chez les patients insuffisants cardiaque dont le tableau clinique est sévère (stade NYHA 3 et 4), leur incidence

est de 3 à 4 fois supérieure comparée aux patients insuffisants cardiaques avec un tableau clinique moins sévère. Ainsi, Pullicino et coll confirment une augmentation du risque d'AVC en fonction de la classe NYHA et l'altération de la FEVG ²³

L'insuffisance cardiaque non seulement augmente le risque d'AVC mais également la morbi mortalité après la survenue d'un AVC. D'autres auteurs ont rapporté que la mortalité après un AVC est de 2 à 4 fois plus élevée lorsque le patient présente une insuffisance cardiaque. ^{24 25}.

De plus, non seulement les patients insuffisants cardiaques présentent des AVC plus handicapant sur le plan moteur mesuré par l'échelle de score de Rankin ²⁶ mais la prévalence d'AVC silencieux y est plus élevée :

respectivement 20 et 42% vs 0-12% chez les non insuffisants cardiaques ²⁷ avec des conséquences à terme sur les fonctions cognitives.

Toutefois, il semble important de savoir si l'insuffisance cardiaque induit à elle seule le risque thromboembolique indépendamment de la survenue d'une fibrillation atriale.

Dans l'étude SAVE portant sur les patients ayant une FEVG<40% après infarctus du myocarde, le taux d'AVC à 5 ans est de 8,1% et pour chaque diminution de 5% de la FEVG, il existe une augmentation de 18% du risque d'accident cérébral parallèlement à l'augmentation de la prévalence de la fibrillation atriale. ²⁸

Ceci suggère que dysfonction ventriculaire gauche, fibrillation atriale et accident vasculaire cérébral ont des mécanismes physiopathologiques communs. Dans l'étude CHARM (Candesartan in chronic heart failure) menée sur des patients insuffisants cardiaques, le taux d'AVC était de 3% chez les patients avec ou sans dysfonction ventriculaire gauche. Cependant, ce taux augmente de manière significative à 9% chez les patients développant une fibrillation atriale durant cette période ce qui implique que cette dernière contribue à l'augmentation du risque d'AVC chez les patients insuffisants cardiaques. ²⁹ Dans la sous analyse de l'étude SPORTIF III et SPORTIF V portant sur des patients avec une fibrillation

atriale, ceux d'entre eux ayant des signes d'insuffisance cardiaque ont un taux d'événements (critère composite : mortalité toutes causes, infarctus du myocarde, événement embolique systémique et hospitalisation pour insuffisance cardiaque) de 10,8% par an significativement supérieur aux patients en fibrillation atriale sans signe d'insuffisance cardiaque : 4,2% par an.

II.1.4. Insuffisance cardiaque et traitement antithrombotique

II.1.4.1. Traitement anticoagulant et insuffisance cardiaque chronique

Plusieurs études randomisées et registres ont évalué le bénéfice potentiel d'un traitement anticoagulant oral de type antivitamine K (AVK) par warfarine, essentiellement dans le cadre de l'insuffisance cardiaque chronique.

Cependant, la plupart des études comme HELAS (Heart Failure Long-Term Antithrombotic Study)³¹ et WASH (Warfarin Aspirin Study in Heart Failure)³² n'avaient pas la puissance nécessaire pour démontrer la supériorité du traitement anticoagulant dans cette indication.

L'étude HELAS a étudié séparément les patients insuffisants cardiaques en fonction de l'origine ischémique ou non de la cardiopathie. L'incidence du critère composite (AVC non fatal, embolie périphérique ou pulmonaire, infarctus du myocarde, ré hospitalisation pour insuffisance cardiaque ou décès) est de 14,9% vs 15,7% par an chez les patients présentant une insuffisance cardiaque d'origine ischémique recevant respectivement de l'aspirine et de la warfarine. Ce taux était de 14,8% vs 8,9% par an chez les patients ayant une cardiomyopathie primitive. Cependant, un nombre trop limité de patients (n=197) ne permettait pas de mettre en évidence une différence entre ces deux groupes. Il est à noter dans le groupe warfarine un nombre d'hémorragies graves de 4,6% par an³¹.

L'étude WATCH (Warfarin and Antiplatelet Therapy in Chronic Heart Failure) n'a pas réussi non plus à inclure un nombre suffisant de patients (n= 1587 au lieu de 4500 patients prévus). Les résultats concernant le critère primaire (décès, IDM, AVC) ne varie pas significativement entre les différentes thérapeutiques utilisées : warfarine versus aspirine (hazard ratio HR: 0,98 ; p=0,77), clopidogrel versus aspirine (HR: 1,08, p=0,57) ou warfarine versus clopidogrel (HR: 0,89 ; p=0,39).³³ L'étude la plus récente : WARCEF (Warfarin versus Aspirin in reduced cardiac Ejection Fraction) a inclus 2305 patients insuffisants cardiaques (FEVG \leq 35%) avec une randomisation en deux groupes : warfarine (International Normalized Ratio INR cible entre 2 et 2,5) et aspirine 325 mg/j. Aucune différence significative en terme de critère primaire (décès, AVC ischémique et hémorragie cérébrale n'a été établie entre les deux groupes : warfarine vs aspirine : 7,47% vs 7,93 %/an (HR: 0,93; 95% intervalle de confiance 95% IC: 0,79-1,1, p=0.4)

Lorsque les événements sont considérés de manière individuelle, il n'y a pas de différence en terme de décès, de survenue d'infarctus du myocarde ou de ré hospitalisation pour insuffisance cardiaque.³⁴

En revanche, le taux d'AVC ischémique est significativement plus bas dans le groupe warfarine (0,72% par an versus 1,36% par an, HR 0,52 (0,33–0,82), p= 0,005). Au final, la réduction de la survenue des événements cérébraux ischémiques dans les études WATCH et WARCEF est contrebalancée par une augmentation du risque d'hémorragie cérébrale et il n'existe aucune modification en terme de survie.

Cependant, il faut rappeler les difficultés pour les patients traités par antivitamine K de rester dans la cible thérapeutique. Ainsi, Homma et coll ont mis en évidence une différence significative sur le critère composite (décès, AVC ischémique et AVC hémorragique) au profit des patients avec une cible thérapeutique plus fréquemment atteinte. Ceci suggère qu'un traitement anticoagulant plus efficace et plus sûr pourrait avoir un effet bénéfique dans ce contexte ce qui ouvre la voie aux nouveaux anticoagulants oraux³⁵.

Tableau 1 Etudes randomisées portant sur le traitement antithrombotique dans l'insuffisance cardiaque

Etudes	n	Traitements	Population	Durée suivi	Critères d'évaluation	Evénements en fonction du critère primaire		Résultats statistiques RR(95% intervalle confiance), valeur p
WASH ³²	279	Aspirine 300 mg versus (vs) Warfarine (INR 2 à 3) vs pas de traitement	Diagnostic clinique d'insuffisance cardiaque FEVG < 35%	27±1 mois	Critère composite : décès, IDM, AVC	Pas de traitement : 26%	Aspirine : 33% Warfarine 26%	Placebo vs Aspirine ou Warfarine : 1,09 (0,63-1,89) Aspirine vs pas d'aspirine : 1,16 (0,74-1,85) Warfarine vs pas de Warfarine 0,88 (0,54-1,43)
HELAS ³¹	197	Cardiopathie dilatée Warfarine vs placebo Cardiopathie ischémique : Warfarine (INR 2.0–3.0) vs aspirine 325 mg	NYHA II-IV FEVG< 35%	18,9-21,9 mois	AVC non fatal, embolie pulmonaire ou périphérique, infarctus myocarde récidivant, réhospitalisation pour insuffisance cardiaque ou décès toutes causes	Nombre d'évènements /100 pts années : avec Aspirine Cardiopathie ischémique : 14,9 Cardiopathie dilatée : 14,8% Nombre d'évènements /100 pts année avec Warfarine Cardiopathie ischémique : 15,7% Cardiopathie dilatée : 8,9%		Pas de différence évaluée en raison du faible effectif
WATCH ³³	1587	Aspirine 162 mg/j vs Clopidogrel (75 mg/j) vs Warfarine (INR 2,5-3,5)	Insuffisance cardiaque symptomatique ; FEVG ≤35 %,	médiane : 21 mois	Mortalité toutes causes, IDM non fatal et AVC non fatal	Aspirine : 20,7% Clopidogrel : 21,6% Warfarine : 19,6%		Warfarine vs Aspirine : 0,98 (0,86-1,12), p=ns Clopidogrel vs Aspirine : 1,08 (0,83-1,4), p=0,57) Warfarine vs Clopidogrel 0,89 (0,68-1,16) p=ns
WARCEF ³⁴	2305	Warfarine(INR 2.5–3.0) vs Aspirine (325 mg)	FEVG ≤ 35%; Rythme sinusal NYHA I à IV	3,5±1,8 ans	Critères composites: AVC ischémique, Hémorragie intracérébrale ou décès toutes causes	Nombre d'évènements 100 patients/an :	Aspirine : 7,93 Warfarine : 7,47	Warfarine vs Aspirine : 0,93 (0,79-1,1), p=0,4
Etudes patients hospitalisés pour une insuffisance cardiaque aigue								
MEDENOX ³⁶		Enoxaparine 40 mg/j vs Placebo	Patients hospitalisés, alités Analyse de sous groupe : patients avec insuffisance cardiaque chronique et aigue	14 jours	Maladie thromboembolique entre J1 et J14			Insuffisance cardiaque aigue : 0,29 (0,1-0,84) Insuffisance cardiaque chronique 0,2- (0,08-0,92)

II.1.4.2. un sous-groupe à risque : syndrome coronaire aigu et insuffisance cardiaque

II.1.4.2.1. Double anti-agrégation plaquettaire et insuffisance cardiaque

La double anti-agrégation plaquettaire comprenant aspirine et un inhibiteur du récepteur P2Y₁₂ (clopidogrel ou prasugrel/ticagrelor) reste une thérapeutique de choix de la prévention secondaire des patients ayant présenté un syndrome coronaire aigu ^{37,38}.

Le registre danois incluant des patients avec un syndrome coronaire aigu sans revascularisation coronaire montre une réduction de 14% de la mortalité à 18 mois chez les patients insuffisants cardiaques traités par clopidogrel vs patients sans clopidogrel (n = 5050; HR: 0,86; 95 % CI: 0,78–0,95), une réduction non confirmée dans le groupe de patients sans insuffisance cardiaque (n = 6092; HR: 0,98; 95 % CI: 0,83–1,16) ³⁹. Cette analyse de sous-groupe pourrait laisser penser à un effet modeste mais réel de l'antiagrégation plaquettaire dans l'insuffisance cardiaque

II 1.4.2.2 Bivalirudine et insuffisance cardiaque

La bivalirudine, analogue synthétique de l'hirudine, est un inhibiteur direct de la thrombine étudié essentiellement dans le cadre de l'angioplastie coronaire et préférentiellement chez les patients présentant un syndrome coronarien aigu. Dangas et coll se sont intéressés à l'impact de ce traitement dans leur méta-analyse incluant 3 études randomisées : Randomized Evaluation in PCI Linking Angiomax to Reduced Clinical Events (REPLACE-2) ⁴⁰, Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy (ACUITY)⁴¹, et Harmonizing Outcomes with Revascularization and Stents in Acute Myocardial Infarction (HORIZONS-AMI) ⁴².

Dans cette méta-analyse, la bivalirudine est associée à une diminution de la mortalité à 1 an comparée à l'association héparine et anti-GPIIb/IIIa. Dans l'analyse de sous-groupes, seule une réduction de la mortalité significative est notée chez les patients traités par bivalirudine et présentant une dysfonction ventriculaire gauche et dans le groupe syndrome coronaire aigu avec élévation du segment ST⁴³.

Cela permet donc d'émettre l'hypothèse d'un rôle bénéfique de l'inhibition de la thrombine chez les patients insuffisants cardiaques présentant un syndrome coronaire aigu. Il faut toutefois se demander, à la lecture de ces données de sous-groupes s'il s'agit vraiment d'un effet propre à l'insuffisance cardiaque ou plutôt d'un effet lié au syndrome coronaire aigu et aux traitements percutanés des lésions coronaires⁴⁴.

II.1.4.3. Nouveaux anticoagulants oraux et insuffisance cardiaque.

Les nouveaux anticoagulants oraux (NACO) ont un mécanisme d'action différent des AVK. Leur mécanisme d'action correspond à une inhibition directe des facteurs IIa (thrombine) ou Xa et ils ont pour particularité de ne pas nécessiter de surveillance des paramètres de coagulation. Ils ont été étudiés initialement chez les patients exclusivement en fibrillation atriale en comparaison avec le traitement par AVK et dans la maladie thromboembolique à titre prophylactique et curatif. Pour ce qui concerne la fibrillation atriale, les études concernées sont ARISTOTLE, RE-LY et ROCKET-AF.

Dans une méta-analyse menée sur les patients en fibrillation atriale et prenant en compte les différentes études citées, les NACO ont une efficacité de 22% supérieure à celle de la warfarine dans la prévention de l'accident vasculaire cérébral avec une diminution significative du risque d'hémorragie intracranienne⁴⁵. Le registre national danois nous confirme que l'efficacité des NACO est supérieure à la warfarine en terme de bénéfice clinique net chez les patients avec un score de risque CHADS₂ ≥ 1 ou CHA₂DS₂ VASc ≥ 2. Ce

bénéfice est d'autant plus élevé que le risque d'accident vasculaire cérébral théorique et le risque hémorragique théorique dans la population cible sont élevés ⁴⁶.

Ahmad et coll ont étudié spécifiquement le sous-groupe des patients insuffisants cardiaques inclus dans les trois études randomisées précédentes. ⁴⁷. Les résultats ne montrent pas de réduction significative en termes d'événements majeurs dans le groupe NACO comparé à la warfarine. Cependant, la définition de l'insuffisance cardiaque diffère dans ces trois études ce qui constitue un biais majeur d'analyse pour cette étude de sous-groupe.

Selon la définition de l'insuffisance cardiaque retenue, les sujets insuffisants cardiaques représentent plus de 30% des patients inclus dans chacune de ces études. Cependant, les définitions varient : pour l'étude RELY, il s'agit d'une FEVG \leq 40%, une dyspnée de stade NYHA II ou un épisode d'insuffisance cardiaque dans les 6 mois précédents ; pour l'étude ROCKET-AF : une FEVG \leq 35% ou des signes cliniques d'insuffisance cardiaque à l'inclusion et l'étude ARISTOTLE une FEVG \leq 40% ou des signes cliniques d'insuffisance cardiaque dans les 3 mois précédents.

Tableau 2 Nouveaux anticoagulants oraux et insuffisance cardiaque

	Patients (patients insuffisants cardiaques (n=)	Traitement et Critères primaires	Résultats	Résultats statistique (valeur p)
Dabigatran (anti IIA) RE-LY (Randomised Evaluation of Long term anticoagulant Therapy	Patients en fibrillation atriale n=: 4904	Warfarine vs Dabigatran 110 mg vs Dabigatran 150 mg Suivi 2 ans Critère : survenue AVC	Warfarine 1,85% vs Dabigatran 110 mg 1,9% vs Dabigatran 150 mg 1,44%	pas de différence significative (p=0,42 et 0,33)
Apixaban (anti Xa) ARISTOTLE (Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in atrial fibrillation	Patients en fibrillation atriale n= 5541	Warfarine vs Apixaban 5 mg Suivi 1,8 ans Critère : AVC ischémique, hémorragique et embolies systémiques	Warfarine 1,6% vs Apixaban 1,4%	pas de différence significative (p=0,46)
Rivaroxaban (anti Xa) ROCKET AF (Rivaroxaban Once Daily Direct Factor Xa Inhibition Compared with Vitamin K Antagonist for Prevention of Stroke and Embolism Trial in Atrial fibrillation	Patients en fibrillation atriale n=8851	Warfarine vs 20 mg Rivaroxaban Suivi 1,7 ans Critère : AVC et embolie systémique	Warfarine 3,9 % vs Rivaroxaban 3,6%	pas de différence significative (p=0,48)
ATLAS ACS TIMI 51 (anti-Xa Therapy to Lower cardiovascular Events in Addition to Standard Therapy in Subjects with Acute Coronary Syndrome-Thrombolysis in Myocardial Infarction	Syndrome coronaire aigu récent n=: 483	Placebo vs Rivaroxaban 2,5mg vs Rivaroxaban 5 mg Suivi 13 mois décès CV, IDM ou AVC	Placebo 16,8% vs Rivaroxaban 10,1% (Rivaroxaban 2,5 mg)	

IDM : infarctus du myocarde, SCA : syndrome coronaire aigu, CV : cardiovasculaires

Plusieurs auteurs ont étudié l'intérêt des nouveaux anticoagulants, anti thrombine direct et anti Xa dans le cadre du syndrome coronaire aigu. Que ce soit le dabigatran dans l'étude de phase II RE-DEEM (Randomized Dabigatran Etxilate Dose Finding Study in Patients with Acute Coronary Syndromes Post Index Event with Additional Risk Factors for Cardiovascular Complications alsoReceiving Aspirin and Clopidogrel) trial ⁴⁸ ou l'étude de phase III APPRAISE-2 (Apixaban for Prevention of Acute Ischemic Events 2), aucune de ces 2 études n'a montré d'effet bénéfique de l'administration de ce traitement anticoagulant ⁴⁹, avec même un surcroit de saignements majeurs pour l'apixaban comparé au placebo (HR: 2,59; p = 0,001).

L'étude ATLAS ACS 2—TIMI 51 (Anti-Xa Therapy to Lower Cardiovascular Events in Addition to Standard Therapy in Subjects with Acute Coronary Syndrome- Thrombolysis in Myocardial Infarction 51) a évalué l'action du rivaroxaban (2,5 mg or 5 mg deux fois par jour versus placebo associé à une association anti agrégante ASA/clopidogrel) dans le syndrome coronaire aigu ⁵⁰.

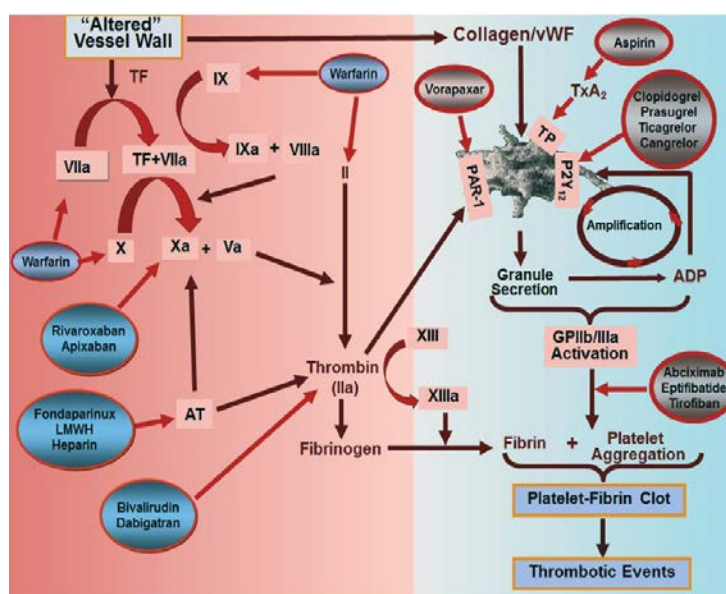
Cette étude a montré une réduction du risque sur un critère primaire composite (décès cardiovasculaire, infarctus myocarde et AVC) de 16% à 2 ans et pour le rivaroxaban à 2,5 mg 2 fois par jour, une réduction de 32% sur le critère décès toute cause. Ceci s'accompagne d'une augmentation du nombre total de saignements sans pour autant affecter le nombre de saignements majeurs ⁵⁰

Cette étude s'est ensuite intéressée au sous-groupe de patients insuffisants cardiaques. L'étude non publiée de sous-groupe d'ATLAS-2 concernant les patients avec signe d'insuffisance cardiaque à l'admission a montré un bénéfice associé au rivaroxaban à dose de 2,5 mg deux fois par jour sur le critère (décès cardiovasculaire, infarctus du myocarde et AVC) à 13 mois (18.6% avec placebo versus 11.6% avec rivaroxaban (p <0.001), les critères décès

cardiovasculaires et (10,4% vs 5,2% avec rivaroxaban ($p < 0.001$) et décès toutes causes (11,1% vs 5,3% avec rivaroxaban ($p < 0.001$)) (Janssen Research & Development, LLC. Data on file). Cette analyse rétrospective ad-hoc de sous-groupe d'insuffisants cardiaques va dans le sens d'un effet bénéfique du rivaroxaban (anti Xa) dans le cadre de l'insuffisance cardiaque d'origine ischémique.

Ces résultats corroborent l'hypothèse de l'implication d'un mécanisme thrombotique dans le mauvais pronostic de la maladie soutenue par F. Zannad et al ⁵¹ Ceci a conduit à la mise en place d'un essai explorant des doses anti-thrombine et infra anti-coagulantes du rivaroxaban, dans l'insuffisance cardiaque ischémique suite à une décompensation aiguë (COMMANDER-HF, clincialtrials.gov NCT01877915, F Zannad, Investigateur principal).

Figure 1 Les cibles thérapeutiques des traitements antithrombotiques dans l'insuffisance cardiaque ⁴



Différentes cibles thérapeutiques des traitements antithrombotiques dans l'insuffisance cardiaque : activité anti Xa (Rivaroxaban, Apixaban), activité anti Iia, VIIa, IX, X (Warfarine), anti Iia (Bivalirudine, Dabigatran, Fondaparinux), activité antiplaquettaire avec les inhibiteurs du récepteur P2Y12 (Clopidogrel, Efiend), antiGPIIbIIIa (Abciximab, Eptifibatide, Tirofiban)

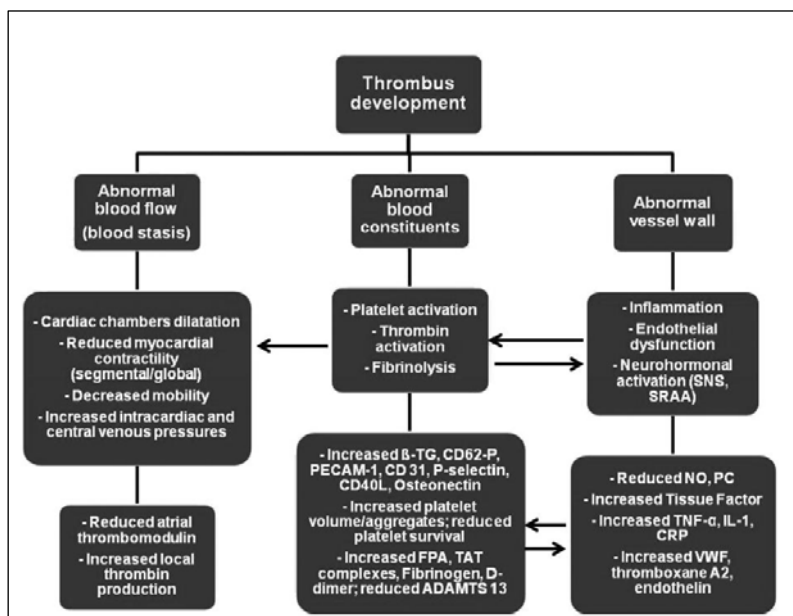
II.2. Hypercoagulabilité et Insuffisance cardiaque : physiopathologie

Différentes hypothèses expliquant l'hypercoagulabilité dans l'insuffisance cardiaque ont été développées dans la littérature ces deux dernières décennies. Les mécanismes physiopathologiques précis de cette hypercoagulabilité restent cependant à déterminer, même les différentes composantes de la triade de Virchow (atteinte du flux sanguin, de la paroi vasculaire et des constituants plasmatiques) semblent impliquées dans ce processus (figure 2). L'hypercoagulabilité liée à l'augmentation des réactions procoagulantes, à l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (PAR : protease-activated receptors), aux actions procoagulantes médiées par l'adénosine ou par l'activation neurohormonale mais également à la dysfonction endothéliale et à l'inflammation sont autant de mécanismes d'intérêt. Les tableaux 3 et 4 résument les différents marqueurs biologiques de coagulation étudiés dans la littérature en fonction du caractère aigu et chronique de la décompensation cardiaque.

Yamamoto et coll ont rapporté il y a déjà 20 ans chez les patients insuffisants cardiaques une concentration importante de fibrinopeptide A et de complexes thrombine antithrombine ⁵². Les patients insuffisants cardiaques présentent également des taux élevés de beta thromboglobuline, de fragments de prothrombine 1+2 et de D dimères, une activation plaquettaire anormale, une activation de la cascade de la coagulation et de la fibrinolyse ^{53, 54}. ⁵⁵. L'augmentation de concentration de ces différents marqueurs est corrélée à l'évolution clinique défavorable de l'insuffisance cardiaque ⁵³. L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène et le dosage antigénique de l'activateur du plasminogène tissulaire sont également élevés chez les patients à l'occasion d'une décompensation cardiaque indépendamment de la fonction ventriculaire gauche.

Nous résumons, dans ce chapitre, les différents mécanismes physiopathologiques participant à l'état d'hypercoagulabilité des patients insuffisants cardiaques et leurs interactions avec la thrombine, élément clé dans la cascade de la coagulation.

Figure 2 Différents mécanismes conduisant à l'hypercoagulabilité dans l'insuffisance cardiaque ⁵⁶



β -TG = β thromboglobuline, CD31 : molécules d'adhésion cellulaire endothéliale, CD-62 P selectine plaquettaire, CRP : protéine C réactive, FPA : fibrinopeptide, IL-1 : interleukine-1, NO :oxyde nitrique PC : prostacycline, PECAM-1 :molécule d'adhésion cellulaire plaquettaire, SNS : système nerveux sympathique, SRAA : système rénine angiotensine aldostérone, TAT : thrombine-antithrombine III, TNF α : tumor necrosis factor, vWF : facteur de von Willebrand

Tableau 3 Paramètres d'hypercoagulabilité dans l'insuffisance cardiaque aiguë

Etudes	Population	Paramètres étudiés	Conclusions
Mehta et Mehta ⁵⁷	11 patients insuffisants cardiaques vs 10 patients sains	Agrégation plaquettaire	↑ Agrégation plaquettaire Corrélée à la résistance vasculaire
Sbarouni et coll ⁵⁸	21 patients insuffisants cardiaques	Viscosité plasmatique Fibrinopeptide A, D-dimères, vWF	↑ vWF et viscosité, fibrinopeptide A et D-dimères Corrélation vWF et Angiotensine II et endothéline
Jabri et coll ⁵³	70 patients insuffisants cardiaques vs 41 patients avec coronaropathie vs 36 patients sains	β TG, PF4, D-dimères, TAT	↑ β TG, D-dimères, TAT mais pas PF4 chez les patients insuffisants cardiaques D-Dimères augmentés patients insuffisants cardiaques vs sujets sains
Serebruany et coll ⁵⁹	100 patients insuffisants cardiaques	Agrégation sang total, P selectine, GPIIb/IIIa	↑ Agrégation sang total et expression GPIIb/IIIa et P-selectine
Serebruany et coll ⁶⁰	37 patients insuffisants cardiaques vs 14 sujets sains	PECAM-1, ostéonectine	↑ PECAM-1, ostéonectine
Yamamoto et coll ⁵²	13 patients insuffisants cardiaques vs 17 patients ayant une cardiopathie hypertrophique vs 20 sujets sains	β TG, PF4, Fibrinopeptide A, TAT, D-dimères	↑ Fibrinopeptide A, TAT dans les 2 groupes vs sujets sains

II.2.1. Hypercoagulabilité et dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale joue un rôle important dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et dans le devenir des patients au long cours^{61, 62}. Il est clairement démontré que la vasoréactivité de l'artère brachiale est inversement proportionnelle au devenir des patients insuffisants cardiaques⁶³. Katz et al ont montré qu'une production de NO (nitric oxide) augmentée et une diminution de la vasodilatation de l'artère brachiale médiée par le flux sont associées à un risque augmenté de décès et de transplantation cardiaque à 12 mois⁶³. Inversement, la rééducation cardiaque semble améliorer cette dysfonction endothéliale et le devenir au long cours des patients⁶⁴. Une augmentation significative de la concentration des marqueurs suivants a été mise en évidence dans l'insuffisance cardiaque chronique : thrombomoduline, growth endothelial factor, intercellular adhesion molecules (ICAM), platelet and endothelial adhesion molecules (PECAM), tissue-type plasminogen activator (t-PA) and vascular cell adhesion molecules (VCAM)⁶⁵⁻⁶⁸. Différents auteurs ont étudié les marqueurs de dysfonction endothéliale chez les patients insuffisants cardiaques et leurs interactions avec des facteurs de coagulation plasmatiques, cytokines et des dérivés plaquettaires. Ainsi, l'augmentation du vWF qui accompagne l'altération endothéliale contribue à l'état prothrombotique des patients en favorisant l'adhésion plaquettaire à l'endothélium⁶⁹. La relation entre fonction endothéliale et thrombine est intéressante à étudier. Il est bien admis depuis les années 1980 que la thrombine, enzyme clé de la cascade de la coagulation, favorise des modifications importantes du tonus vasculaire par l'activation des cellules endothéliales⁷⁰. Cet enzyme est capable d'induire une vasorelaxation endothélium dépendante sur un modèle animal ou chez l'homme^{70, 71}. Les mécanismes de la vasorelaxation endothélium dépendante en réponse à l'action de la thrombine impliquent l'activation de eNOS (endothélium nitric oxide synthase) pour produire du NO à partir de la L-arginine ou la libération de prostacyclines à partir de la voie de

cyclooxygénase⁷². Cet effet rapide de la thrombine sur l'endothélium représente un important mécanisme de contrôle pour prévenir la vasoconstriction et la formation de thrombus dans des conditions physiologiques. Dans des conditions pathologiques comme l'athérosclérose, l'expression de la eNOS est significativement réduite et ceci contribue largement à l'altération de l'action de la NO synthase. D'autre part, la production d'endothéline-1 et l'expression d'ECE-1 (endothelin-converting enzyme) sont augmentées dans ces conditions pathologiques. Eto et coll ont étudié les mécanismes qui régulent l'expression de eNOS et ECE-1 dans ces conditions pathologiques⁷³. Si les mécanismes de la relaxation endothélium dépendante en réponse à la thrombine impliquent l'activation de eNOS pour produire du NO⁷², ces auteurs ont démontré que l'effet prolongé de la thrombine sur l'expression du eNOS conduit à la suppression de la NO synthase et à l'expression d'ECE-1 par les cellules endothéliales via la voie du Rho/ROCK et celle de l' extracellular signal–regulated kinase.

II.2.2. Hypercoagulabilité et activation plaquettaire

Les marqueurs d'activation plaquettaire tiennent une place importante dans les travaux portant sur les troubles de l'hémostase dans le cadre de l'insuffisance cardiaque. Mehta et al ont rapporté, il y a maintenant plus de 30 ans, que les patients insuffisants cardiaques ont un taux d'agrégats plaquettaires significativement plus important par rapport aux sujets sains⁵⁷. De nombreux marqueurs d'activation plaquettaire ont donc été étudiés dans cette pathologie : du l'étude du volume plaquettaire aux molécules qui participent à cette activation à celles qui interagissent avec d'autres cellules. Ces molécules peuvent être exprimées à la surface des plaquettes (molécule 1 d'adhésion cellulaires plaquettes/endothélium, ostéonectine), elles peuvent être sécrétées sous forme soluble (β thromboglobuline) ou les deux (P-sélectine, CD-40 ligand).

La β thromboglobuline est une protéine spécifique des plaquettes. Selon Jafri et coll, le taux de β thromboglobuline augmente en cas d'insuffisance cardiaque comme le facteur plaquettaire 4 (PF4) et ceci indistinctement de l'origine de la cardiopathie, qu'elle soit ischémique ou idiopathique ⁵³. Il s'agit d'un marqueur sensible mais pas très spécifique de l'activation plaquettaire avec un taux pouvant être influencé par la présence d'une insuffisance rénale ou par le profil lipidique du patient ⁷⁴. L'ostéonectine est présente à la face interne des α granules dans les plaquettes. Lorsque la plaquette est activée, l'ostéonectine est redistribuée à la surface cellulaire durant la fusion des α granules avec la membrane plasmatique ⁷⁵. Le taux d'ostéonectine augmente chez les patients insuffisants cardiaques par rapport aux sujets sains ⁷⁶. O'Connor et coll ont eux montré un taux élevé de P sélectine soluble chez les patients présentant une décompensation cardiaque de même qu'un taux augmenté de P sélectine liée aux plaquettes ⁷⁷.

D'autres molécules d'adhésion ont également été étudiées ⁷⁷. La molécule 1 d'adhésion plaquette/endothélium ou PECAM-1 est une glycoprotéine transmembranaire retrouvée à la surface des plaquettes et des leucocytes et aux niveaux jonctions intercellulaires des cellules endothéliales. Le taux de PECAM-1 est retrouvé significativement plus élevé chez les patients insuffisants cardiaques par rapport aux sujets sains ⁵⁹. D'autre part, ce taux de PECAM-1 ne varie pas significativement selon l'origine de la cardiopathie qu'elle soit ischémique ou primitive

Les relations entre les plaquettes et la thrombine sont également très étroites. Un des mécanismes qui lie l'activation plaquettaire et le devenir des patients insuffisants cardiaques est l'atteinte vasculaire. L'activation plaquettaire conduit à la production secondaire d'agonistes importants tels que le thromboxane A2 et l'adénosine diphosphate (ADP). La rupture de plaque a pour conséquence l'accumulation de facteur tissulaire (FT) à ce niveau et la génération de petites quantités de thrombine, un des plus puissants agonistes plaquettaires.

Les cellules exprimant le FT entrent en contact avec le facteur VII de la coagulation (FVII) activé circulant pour former le complexe TF-FVIIa qui à son tour active le facteur X (FX) et le facteur IX (FIX). Le facteur FXa active initialement des petites quantités de thrombine, qui activent à leur tour plaquettes et d'autres cofacteurs comme FV et le facteur VIII (FVIII). Ainsi, les complexes ténase (FVIIIa-FIXa) et prothrombinase (FVaFXa) sont formés à la surface des plaquettes par l'intermédiaire desquels des quantités plus importantes de thrombine sont générées.

II.2.3. Hypercoagulabilité et inflammation

La baisse de production du NO endothélial dépendant contribue à la vasoconstriction périphérique et favorise l'adhésion plaquettaire et monocytaire à l'endothélium participant à cet état d'hypercoagulabilité. La concentration de ces marqueurs d'altération endothéliale est corrélée à la concentration de cytokines inflammatoires et des molécules d'adhésion : le vWF avec ICAM, IL6 et thrombomoduline avec ICAM par exemple.^{78, 79} Nombreux sont les travaux menés sur le plan expérimental ou clinique qui suggèrent que l'inflammation joue un rôle dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque^{78, 80} ainsi que la progression, la sévérité et le pronostic de cette affection⁸¹. Le fait que plusieurs cytokines pro inflammatoires soient impliquées dans la pathogénie de la dysfonction ventriculaire gauche⁸² et qu'elles contribuent au tableau clinique de cachexie chez les patients insuffisants cardiaques sévères est à l'origine du regain d'intérêt pour le rôle de l'inflammation et de ses marqueurs dans l'insuffisance cardiaque. Anand et coll confirment que les patients avec un niveau élevé de CRP (C reactive protein) ont un tableau clinique d'insuffisance cardiaque plus sévère et la concentration de CRP plasmatique est significativement corrélée à la morbidité de ces patients insuffisants cardiaques⁸¹. Depuis les données initiales de Levine et coll en faveur

d'un taux élevé de TNF alpha dans l'insuffisance cardiaque⁸³, plusieurs études ont également rapporté ensuite des taux élevés pour les cytokines : cardiotropin-1, IL-1, IL-6 et IL-18 aussi bien que des taux élevés de chemokines⁸³⁻⁸⁵. Selon les travaux de Chin et coll menés sur des patients présentant une insuffisance cardiaque aigue, il existe une corrélation significative entre IL6, facteur tissulaire (FT) et survie des patients à 6 mois.⁶⁸

- l'inflammation induit la coagulation :

L'interaction entre inflammation et coagulation a largement été étudiée. Non seulement ces deux processus sont associés dans le temps, mais il semble exister de nombreux liens entre les deux⁸⁶. L'inflammation active la coagulation principalement par les trois mécanismes que sont l'induction du FT par les cytokines, l'inhibition de la fibrinolyse et l'altération de la fonction anticoagulante du système de la protéine C. Le FT joue un rôle central dans l'activation du processus de coagulation dans de nombreuses pathologies.

Dans les états inflammatoires, les monocytes peuvent exprimer le FT à leur surface. Ce FT se lie et active le facteur VII (FVIIa) ce qui conduit à l'activation du système de coagulation

Le fait de bloquer l'action du FT revient à empêcher la génération de thrombine dans les modèles animaux de choc septique⁸⁷. Les cytokines inflammatoires jouent un rôle important dans l'activation de la coagulation. L'injection de TNF α chez des volontaires sains induit non seulement une réponse inflammatoire systémique mais également comme l'indiquent Van der Poll et coll, une activation de la coagulation caractérisée entre autre par l'augmentation de la concentration plasmatique des fragments de la prothrombine (F1+2).⁸⁸ Cependant, le blocage du TNF α par un anticorps monoclonal ne neutralise pas l'activation de la coagulation dans un modèle animal d'endotoxémie [14] contrairement à l'IL-6 dont le

bloccage atténue l'activation de la coagulation locale et systémique dans un modèle de sepsis^{89, 90}. Ces données suggèrent que le rôle de toutes les cytokines dans ce processus n'est pas identique et l'IL-6 est un médiateur important pour l'activation de la coagulation induite par l'inflammation. L'inflammation améliore la disponibilité du FT de différentes manières⁹¹. La perte de jonction entre les cellules endothéliales durant l'inflammation expose à l'expression du FT de la paroi adventitielle des vaisseaux de gros calibre. L'inflammation favorise la synthèse de FT dans les cellules endothéliales, cellules dendritiques et les monocytes/macrophages. Elle favorise la propagation de microparticules de différentes origines cellulaires notamment des microparticules d'origine monocyttaire exprimant des quantités élevées de FT à leur surface qui sera utilisé comme un pool de FT par les autres microparticules et ce qui leur confèrera une activité procoagulante plus élevée⁹².

- le processus de coagulation et la thrombine active l'inflammation :

La réponse inflammatoire est modulée par un certain nombre de complexes comme le TF/FVIIa/FXa mais aussi les facteurs Xa, VIIa ainsi que la thrombine. Au final, l'endothélium et les monocytes/macrophages sont ainsi activés et la sécrétion d'interleukines comme l'IL1, IL8 et surtout IL6 augmentées^{93, 94}. La thrombine est la protéase de coagulation qui a le plus d'actions parfois divergentes sur l'inflammation. La thrombine exerce une action sur les monocytes/macrophages (production d'IL8), sur les plaquettes, sur les mastocytes (dégranulation) et sur les cellules endothéliales (production d'IL-6, IL-8, production de MCP-1 (monocytes chemoattractant protein-1), expression de molécule d'adhésion, synthèse de PAF.). In vivo, l'administration de FVIIa chez des sujets sains augmente de manière importante la concentration d'IL-6 et IL-8. Cependant, rien ne montre pour l'instant

l'efficacité de l'inhibition pharmacologique de la voie de la thrombine dans l'évolution du processus inflammatoire ou du sepsis.

- les récepteurs PAR modulent l'inflammation

Les effets cellulaires pro inflammatoires des protéases de la coagulation mais aussi les effets anti inflammatoires de la voie de la protéine C activée sont médiés par les PAR ⁹⁵. Les PAR, dont 4 types ont été identifiés, sont des protéines transmembranaires exprimées, entre autre, à la surface des cellules mononucléaires, de cellules endothéliales, des plaquettes, des fibroblastes et des cellules musculaires lisses ⁹⁶. L'activation de ce récepteur est la résultante d'un processus unique dans lequel la protéase clive la partie terminale extracellulaire du récepteur démasquant ainsi une séquence qui sert de ligand intramoléculaire et permet le signal transmembranaire. Ainsi, la thrombine exerce ces effets proinflammatoires au travers de PAR-1 mais elle a aussi une haute affinité pour les récepteurs PAR-3 and -4 ⁹⁶. Par ce mécanisme, la thrombine induit la production de cytokines proinflammatoires in vitro comme IL-6, IL-8, et des facteurs de croissance ou le facteur inhibiteur de la migration macrophagique ^{97,98} alors que l'activation du PAR-2 (par les complexes FT/FVII, FT/FVII/Xa mais aussi FXa isolément) induit une augmentation de la production de molécules d'adhésion cellulaire et d'autres molécules comme les ROS (reactive oxygen species). De plus, l'action de la thrombine sur le PAR associé au facteur nucléaire kB augmente l'expression des molécules d'adhésion et favorise l'adhésion leucocytaire. ⁹⁹. Le récepteur PAR-1 a des propriétés qui divergent en fonction de la nature de son activateur. Le paradoxe réside dans le fait que l'activation du PAR-1 par la thrombine a des conséquences pro inflammatoires et sur la perméabilité vasculaire alors que le même récepteur activé par le complexe PCa/EPCR a une action antiinflammatoire ¹⁰⁰. Ceci s'explique par un couplage différent du PAR-1 activé avec les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate (S1P) ¹⁰¹. Dans un cas, l'activation du

PAR-1 par le complexe PCa/EPCR (protéine C activée/récepteur endothélial à la protéine C) active le récepteur S1P-R1 ce qui a des conséquences anti inflammatoires. Dans le cas de la thrombine, l'activation du PAR-1 conduit à l'activation du récepteur S1P-R3 avec pour conséquence une action pro inflammatoire. Ces effets cellulaires de la thrombine par l'intermédiaire des PARs ont déjà été étudié dans l'insuffisance cardiaque. PAR-1 and PAR-4 sont exprimés par les cardiomyocytes, et certains auteurs ont montré que l'activation de ces récepteurs par la thrombine augmente l'entrée du Na dans les cardiomyocytes ¹⁰², la contractilité ¹⁰³, la production de peptide atrial natriurétique et l'hypertrophie ¹⁰⁴. La thrombine semble également augmenter l'apoptose des cardiomyocytes dans les modèles expérimentaux d'ischémie reperfusion. ¹⁰⁴. En effet, cette augmentation de l'apoptose cellulaire par la thrombine est induite in vitro par un mécanisme impliquant l'activation des récepteurs PAR-1, mécanisme réversible par l'addition d'un inhibiteur direct de la thrombine ¹⁰⁴. Cet effet cellulaire direct de la thrombine pourrait favoriser la survenue d'arythmies ce qui peut laisser penser que des inhibiteurs directs de la thrombine pourrait avoir un effet cardio protecteur en dehors de leur effet sur l'inhibition de la coagulation.

II.2.4 Hypercoagulabilité et insuffisance cardiaque : étude de nouveaux mécanismes

Nous développerons dans ce chapitre deux mécanismes pouvant être impliqués dans la physiopathologie de l'hypercoagulabilité des patients insuffisants cardiaques : la voie de la protéine C et les microparticules. Ces mécanismes n'ont été que peu étudiés (microparticules) ou pas du tout (voie de la protéine C) dans l'insuffisance cardiaque aiguë.

II.2.4.1 La voie de la protéine C

II.2.4.1.1 les différentes composantes de la voie de la protéine C

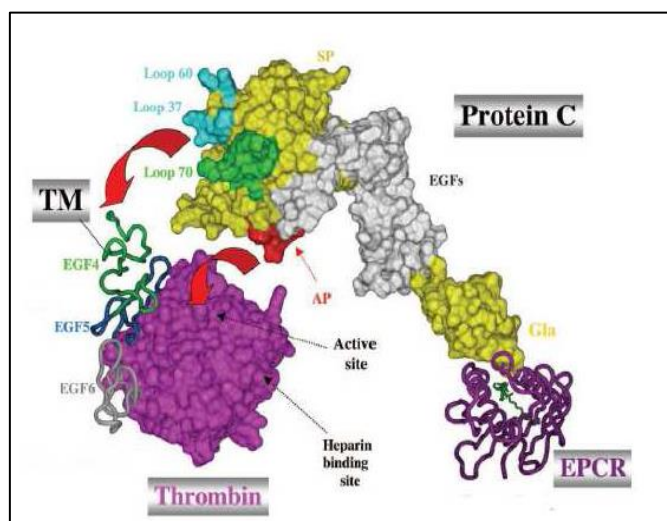
Un état d'hypercoagulabilité peut être la résultante d'une augmentation de concentration des facteurs procoagulants solubles mais également d'une altération d'un système de régulation de la coagulation. Il existe deux principaux systèmes de régulation de la coagulation : ce sont les inhibiteurs circulants, dits stoechiométriques, 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 cellules endothéliales dans la régulation de l'inhibition de la coagulation est majeur.

Le système de la protéine C est un système anticoagulant dynamique comprenant plusieurs facteurs et récepteurs : la protéine C, un récepteur (le récepteur endothélial à la PC : l'EPCR), un catalyseur de l'activation par la thrombine (la thrombomoduline TM), un cofacteur (la protéine S : PS) et un activateur : la thrombine. Toutes ces molécules présentent des similitudes structurales. Elles possèdent ainsi toutes un domaine globulaire situé en position C-terminale pour la protéine C et la protéine S (domaine SHBG pour sex hormon-binding protein) contenant le site catalytique et en position N-terminale pour la TM (domaine

« lectine-like ») et l'EPCR^{105 106}. La protéine C est une glycoprotéine vitamine K dépendante dont l'activation par l'intermédiaire du complexe thrombine-thrombomoduline permet un contrôle de la cascade de la coagulation par un mécanisme de rétrocontrôle négatif. Synthétisée par le foie, la PC circule très majoritairement dans le plasma sous forme d'un zymogène simple chaîne et acquiert une activité sérine protéase une fois clivée par la thrombine. En effet, la thrombine convertit ce zymogène en une protéase active à 2 chaînes reliées entre elles par un pont disulfide. L'élément N terminal de la chaîne légère de la PC contient un domaine non catalytique γ -carboxyglutamique (Gla) suivi de 2 domaines EGF like (epidermal growth factor). Le domaine catalytique de la PC est localisé au niveau de la partie C-terminale de la chaîne lourde de cette molécule. Le domaine Gla avec ces 9 résidus Glu vitamine K dépendants permet l'interaction calcium dépendante de la PC avec la protéine S sur les surfaces membranaires chargées négativement.

L'élément clé de la voie de la protéine C réside dans sa capacité à répondre à la présence de thrombine. L'activation physiologique de la protéine C par la thrombine s'effectue à la surface des cellules endothéliales vasculaires par l'intermédiaire de 2 récepteurs endothéliaux le récepteur endothélial de la protéine C et la thrombomoduline en présence de calcium Cette activité de la PCa a comme cofacteur la protéine S.

Figure 3 Représentation schématique de l'activation de la protéine C sur les surfaces membranaires ¹⁰⁶

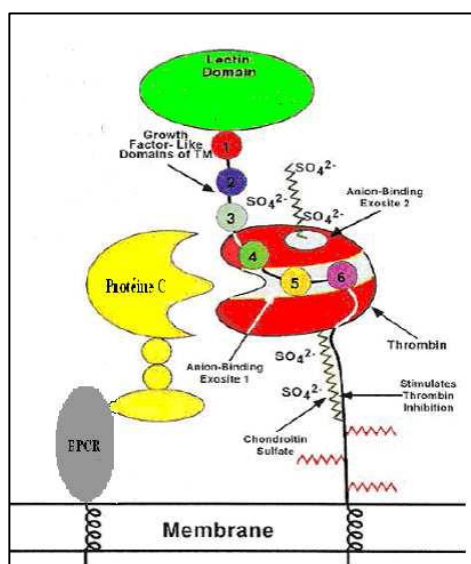


- la thrombomoduline :

La thrombomoduline (TM) est une glycoprotéine membranaire avec une masse moléculaire de 74 Da. Elle est exprimée essentiellement par les cellules endothéliales mais aussi les trophoblastes, les cellules musculaires lisses vasculaires, plusieurs lignées tumorales et par des lignées de mégacaryocytes. Elle possède plusieurs domaines EGF dont les domaines EGF 5 et 6 contenant un site de fixation pour la thrombine au niveau de l'exosite 1 ce qui bloque l'interaction avec les autres protéines se liant à la thrombine et modifie sa spécificité enzymatique. ^{107, 108}. La thrombomoduline accélère l'activation de la protéine C par la thrombine d'un facteur 1000 en présence de calcium ^{109, 110}. L'activation de la PC est ensuite améliorée par la liaison du zymogène par le domaine Gla à l'EPCR au niveau de la surface des cellules endothéliales. Le mécanisme par lequel les 3 co facteurs (TM, Ca, EPCR)

participent à l'activation de la protéine C a été largement étudié. La stabilisation de la boucle 70-80 de la protéine C par le calcium est essentielle pour la reconnaissance et l'activation du zymogène, Une des hypothèses est que la liaison du calcium à la boucle 70-80 induit une modification de conformation dans l'activation de la protéine C et de ce fait améliore sa complémentarité avec la thrombomoduline.

Figure 4 Structure moléculaire de la thrombomoduline ¹⁰⁵



- l'EPCR :

L'EPCR est une glycoprotéine transmembranaire dont la structure en 3 dimensions est composée de 2 hélices α et de 8 feuillets β reliés entre eux permettant la liaison aux phospholipides. La liaison de la protéine C à l'EPCR par l'intermédiaire des domaines Gla permet d'aligner la protéine C au complexe thrombine/TM. Il est à noter que ce récepteur se caractérise par une affinité pour la protéine C strictement identique à celle pour la PC activée.

Contrairement à la TM, l'EPCR est essentiellement exprimé par les cellules endothéliales des gros vaisseaux et beaucoup plus rarement au niveau des capillaires ¹¹¹. Cette différence d'expression des 2 récepteurs (TM et EPCR) entre les gros vaisseaux et les capillaires n'est pas clairement expliquée. Il s'agirait d'un mécanisme de régulation qui permettrait l'équilibre hémostatique quel que soit le calibre du vaisseau ¹¹². L'EPCR n'est pas exclusivement exprimé par les cellules endothéliales mais également par les cellules musculaires lisses vasculaires ¹¹³, les neutrophiles ¹¹⁴, les cellules dendritiques et sur les cellules souches hématopoïétiques. L'EPCR se caractérise par sa capacité à lier la PC à la surface des cellules endothéliales et à augmenter la réaction d'activation de la PC par la thrombine. Mesurée in vitro, l'EPCR membranaire endothélial augmente l'activation de PC en PCa de 4 à 8 fois en améliorant l'alignement de la PC avec la thrombine. Cette activation est augmentée d'un facteur 20 lorsqu'elle est analysée in vivo ¹¹⁵. Dans le cadre de la coagulation, l'EPCR agit sur la disponibilité de la PCa selon deux voies. L'EPCR permet l'activation de la PCa à la surface des cellules endothéliales. Ainsi, lorsqu'on inhibe l'activité de l'EPCR par un anticorps bloquant l'interaction EPCR/ protéine C, l'activation de la PCa induite par la thrombine diminue de près de 88% ¹¹⁵. Plus récemment, il a été montré que l'EPCR est un site de liaison pour le FVII et/ou le facteur FVII activé à la surface de la cellule endothéliale et ce, avec la même affinité (donc en compétition) que pour la protéine C ou la PCa. La liaison EPCR/FVIIa réduit de manière significative l'effet pro coagulant du FVIIa. Cet effet se manifeste en accélérant l'endocytose du facteur VIIa, donc sa clairance. Ceci diminue l'exposition vasculaire et sanguine à ce facteur VIIa qui initie pour une bonne partie avec le FT la voie extrinsèque de la coagulation ¹¹⁶. Parallèlement à cette forme membranaire, il existe une forme soluble de l'EPCR (sEPCR) identifiée dans le plasma humain qui garde les mêmes propriétés de liaison à la PC et à la PCa ¹¹⁷. C'est sous l'action des métalloprotéases et notamment l'ADAM17 (ou TNF-alpha converting enzyme, TACE) que l'EPCR est clivé au

niveau de la membrane cellulaire pour libérer la forme soluble, mais possiblement aussi par la protéase 3 (PR-3) des polynucléaires neutrophiles^{118 119} Ce processus est physiologique mais peut augmenter par l'action de la thrombine et de l'interleukine 1 β ¹¹⁸. Cependant, lorsque la PCa se lie à l'EPCR soluble, elle n'a plus la capacité d'inactiver le facteur Va et ceci est probablement dû à des changements conformationnels.¹²⁰

Si le rôle membranaire de l'EPCR en situation physiologique réside essentiellement dans le maintien de l'anticoagulation dans le sang circulant, le rôle de la forme soluble est moins clair. Elle semble jouer un rôle plutôt procoagulant dans le lupus ou dans le sepsis où le ratio sEPCR/EPCR se modifie vers un versant pro coagulant en raison d'une sur expression de la forme soluble.¹²¹ En plus de ses propriétés anticoagulantes (pour la forme membranaire), l'EPCR a clairement un rôle dans l'inflammation. La plupart des effets de l'EPCR sur l'inflammation ne peuvent pas être dissociés de ceux de la PCa comme nous le reverrons ultérieurement. Ces effets passent notamment par l'interaction PCa -EPCR avec les récepteurs de type Protease activated Receptor (PAR) à la surface des cellules endothéliales¹²²

- la protéine S :

La protéine S est une protéine plasmatique constituée d'une chaîne polypeptidique de 635 acides aminés répartis en plusieurs parties :

- une partie N-terminale identique à celle des protéines vitamine K-dépendantes, comportant un domaine Gla et 4 domaines EGF, le domaine Gla étant séparé d'EGF1 par un segment supplémentaire de 29 acides aminés, contenant un pont disulfure correspondant à la région sensible à la thrombine (TSR).
- une grande partie C-terminale contenant une région homologue à la SHBG (sex hormone binding protein). Ce SHBG like domaine joue un rôle d'intermédiaire dans

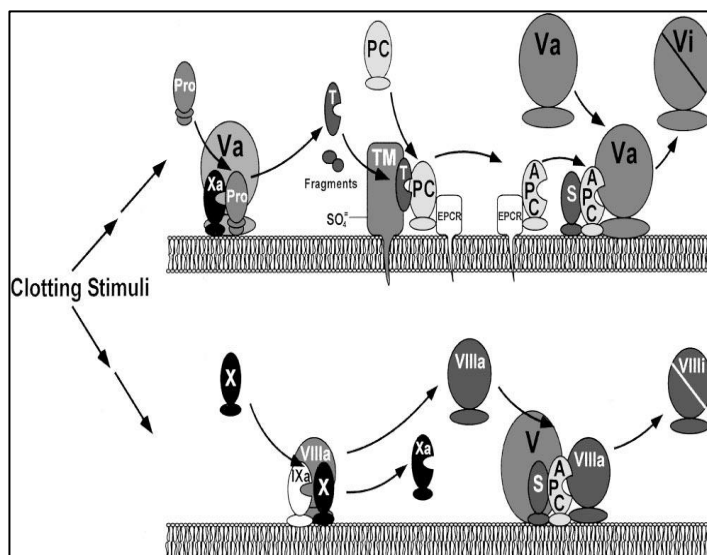
la liaison de la PS avec une protéine du complément : la C4BP (C4 binding protein) ce qui entraîne une inhibition du rôle de la protéine S comme cofacteur de la PCa. Dans le plasma, 60% de la PS est complexé avec le C4BP et seulement les 40% restant libre peuvent agir comme cofacteur de la PCa.

La protéine S, cofacteur plasmatique, participe à la fonction anticoagulante de la PC qui est la dégradation protéolytique des cofacteurs procoagulants FVa et VIIIa. Elle peut se lier également par le domaine Gla à l'EPCR, une interaction importante tant pour l'activité anticoagulante de la protéine C que pour ses propriétés anti-inflammatoires et anti-apoptotiques.

La protéine S possède un effet anticoagulant in vitro indépendamment de la protéine C en inhibant directement les complexes prothrombinase et tenase par différents modes d'action :

- une inhibition du complexe prothrombinase via une liaison directe sur les FVa et FXa
- une compétition entre la protéine S et les complexes tenase et prothrombinase pour la liaison sur les phospholipides anioniques
- une augmentation du clivage en Arg 506 du FVa non lié au FXa ayant pour résultat l'épuisement du FVa libre et la dissociation des complexes FXa/FVa ^{123 124 125, 126}

Figure 5 Rôle régulateur de la protéine C dans l'hémostase



L'expression du facteur tissulaire conduit à la formation des complexes facteurs VIIIa-IXa et Va-Xa et au final à la génération de thrombine. La thrombine peut ensuite être à l'origine de la formation de fibrine, de l'activation plaquettaire et des cellules endothéliales ou elle peut se lier à la thrombomoduline (TM) : elle active alors rapidement la protéine C (APC) ; Cette liaison est favorisée par la fixation de ce complexe à l'EPCR. Une fois la protéine C activée dissociée de l'EPCR, elle se lie à la protéine S et ce complexe inactive les facteurs Va et VIIIa. ¹⁰⁵

II.2.4.1.2 Mécanismes d'action de la PCa

- les actions anticoagulantes de la PCa

La PCa a un rôle d'inhibition de la cascade de la coagulation par la dégradation protéolytique des cofacteurs FVa et FVIIIa qui sont des cofacteurs essentiels pour les FXa et IXa. La PCa clive les facteurs Va et VIIIa et les inhibe via une action protéolytique nécessitant la fixation de l'enzyme (PCa) et ses substrats (FVa et FVIIIa) sur les surfaces phospholipidiques chargées négativement, en présence de calcium, et de la protéine S ¹²⁷. L'inactivation du FVa par la PCa nécessite principalement 2 clivages au site Arg-306 et Arg-

506 localisés sur les domaines A1 et A2 du cofacteur respectivement ¹²⁸. Il a été démontré que la PCa clive ces 2 sites selon un ordre séquentiel, avec un clivage initial survenant rapidement au site Arg-506 suivi d'un clivage plus lent survenant au site arg-306 ¹²⁹. Alors que le clivage du site Arg-506 est relativement rapide et indépendant du cofacteur, le clivage de du site Arg-306 est accéléré d'un facteur 20 par la protéine S ¹³⁰. Le site qui détermine au niveau de la PCa le clivage spécifique du peptide Arg-306 n'est pas identifié. Si le clivage du site Arg-306 par la PCa est bien dépendant de la membrane, cela suppose que la liaison protéine S - protéine C activée conduit à la modification de topographie de la liaison membranaire de la PCa, qui permet à la protéase de reconnaître et de cliver le site Arg-306 sur le surface membranaire ¹³¹. En ce qui concerne le facteur VIIIa, la PCa clive le cofacteur au niveau des sites Arg-336 et Arg-562 localisée sur les sous unités A1 et A2 respectivement ¹³². Contrairement au FVa pour lequel le clivage isolé du site Arg-506 inactive partiellement le cofacteur, le clivage par la PCa de chaque site sur le facteur VIIIa conduit à l'inactivation presque complète de ce cofacteur ¹³³.

- la régulation de l'activité protéolytique de la PCa dans le plasma

Cette activité protéolytique dans le plasma est régulée principalement par trois serpines : l'inhibiteur de la protéine C (PCI), le plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) et l' α 1 antitrypsine. L' α 2-macroglobuline contribue également à la régulation de l'activité de la PCa dans le plasma. Néanmoins, le PCI reste le principal inhibiteur de la PCa même si la concentration des autres inhibiteurs est plus importante dans le plasma et forme un complexe stoechiométrique avec la PCa. Les 2 molécules possédant des sites de liaison aux glycosaminoglycanes, la formation des complexes PCa/PCI est facilitée par l'héparine et les sulfates de dextran. L'inhibition de la PCa par le PCI dépend également de la présence de

phosphatidylsérine au niveau des surfaces, notamment de la membrane plaquettaire et des microvésicules. Outre la PCa, le PCI peut inhiber d'autres protéases comme le FXa, la thrombine mais également le FXIa^{134 135}. Cependant, la PCa réagit très lentement à ces inhibiteurs ce qui a pour conséquence une longue demi vie : 20-25 mn dans le plasma. Un autre mécanisme de régulation de la PCa dans le plasma est représenté par l'endocytose médiée par l'EPCR qui facilite la transcytose de la protéase et sa clairance à partir de la circulation.

De ces 3 serpinés, la réactivité de la PCa avec l' α 1- antitrypsine est la plus longue mais en raison de sa concentration élevée dans le plasma, son rôle de régulation reste important. Si la réactivité des 2 autres serpinés est également assez longue, les cofacteurs de l'héparine et la vitronectine accélèrent notablement la réactivité de la PCa aux PCI et PAI-1. Ainsi en thérapeutique, les hautes concentrations en héparine peuvent accélérer l'inhibition de la PCa par le PCI suggérant l'effet délétère de l'héparine dans le sepsis sévère. Le PCI joue également un rôle important dans la régulation de l'activation de la PC par la thrombine par le fait qu'il inhibe rapidement la thrombine lorsque la protéase forme un complexe avec la thrombomoduline. Il a été démontré que la TM fournissait un site de liaison pour le PCI dans le complexe thrombine-TM et de ce fait facilite une meilleure reconnaissance des serpinés par le complexe contenant la PCa.

- Les effets cytoprotecteurs de la PCa :

Le système de la protéine C possède de multiples fonctions pour maintenir un équilibre entre l'hémostase et les systèmes immunitaires en réponse à une atteinte vasculaire ou inflammatoire. La PCa a des effets protecteurs, en premier lieu, en favorisant la baisse de la

génération de thrombine, puissant activateur cellulaire de l'inflammation. Cependant, des effets directs cellulaires de la PCa indépendants de la thrombine, ont également été rapportés. Les activités cytoprotectrices de la protéine C comportent une activité anti-apoptotique et anti inflammatoire, une action de l'expression de certains gènes et un effet stabilisateur de la barrière endothéliale. L'EPCR ainsi que le PAR 1 joue un rôle central pour l'activité cytoprotectrice de la PCa. Grâce à ses propriétés amidolytiques, la PCa clive PAR-1 et fait intervenir des voies de signalisation intracellulaires comme celles des MAP (mitogen activated protein) kinases et/ou des PI3 Kinases, qui sont des voies de signalisation préférentielles impliquées dans l'activation TNF α .^{136 137} L'activité cytoprotectrice médiée par la PCa nécessite la co-localisation de PAR-1 et d'EPCR dans des cavéoles (vésicules provenant d'une invagination plasmique constituées d'un radeau lipidique et d'une protéine transmembranaire la caveoline) induites probablement par la présence de l'EPCR et elle est initiée lorsque la PCa se lie à l'EPCR et active PAR-1.

Figure 6 Activation du PAR-1 par la protéine C activée

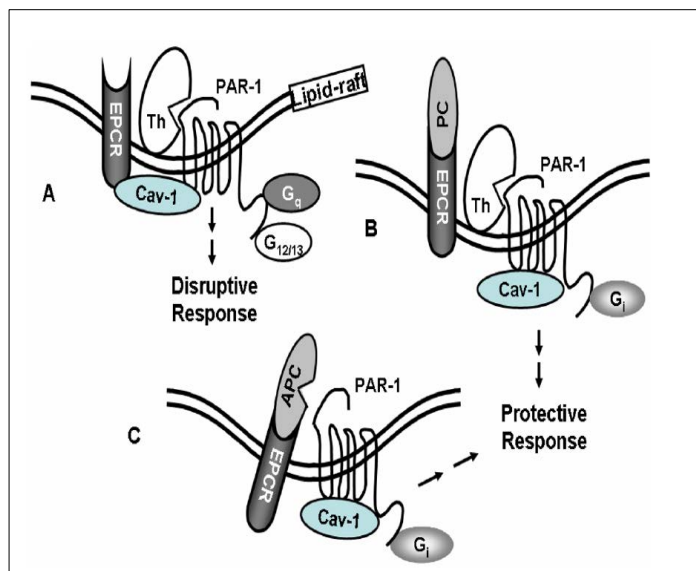


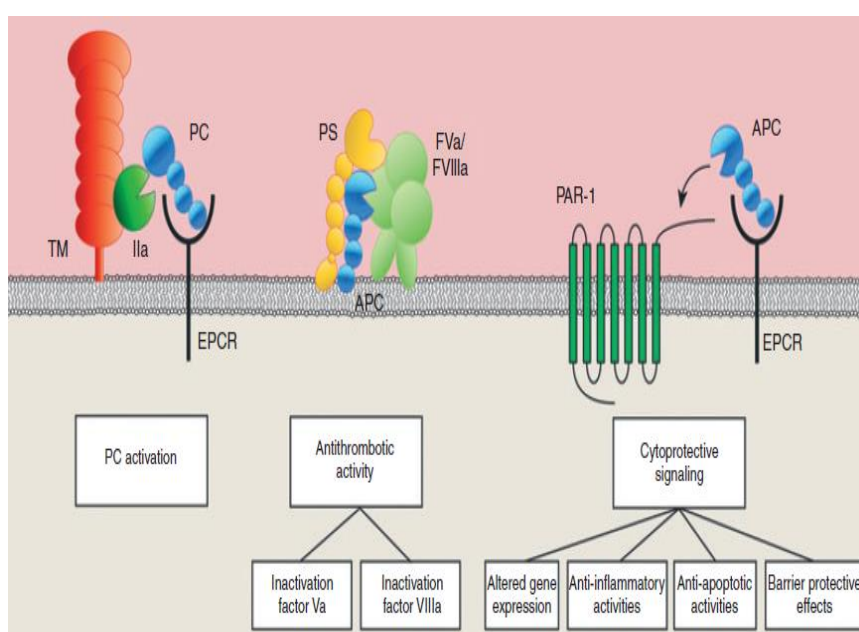
Schéma représentant l'activation du PAR-1 par la PCa et la thrombine lorsque l'EPCR est libre ou occupé par son ligand la protéine C (A). L'EPCR est associé avec la cavéoline-1 (Cav-1) dans le raft lipidique (microdomaine de la membrane plasmatique) des cellules endothéliales lorsque ce récepteur n'est pas occupé par le domaine Gla de la PC/PCa. La thrombine clive PAR-1 et induit une réponse délétère au travers du couplage du récepteur avec les protéines G12/13 et Gq (B). La liaison de l'EPCR avec la PCa conduit à une dissociation de l'EPCR de la cavéoline-1 et de ce fait modifie la spécificité du signal du PAR-1 par son couplage avec la protéine Gi. Ainsi, le clivage du PAR-1 par la thrombine initie une réponse protectrice lorsque l'EPCR est occupé (C). Il s'agit du même mécanisme que (B) exception faite que la PCa induit une réponse protectrice dépendante de l'EPCR et de PAR-1. ¹³⁸

Les propriétés cytoprotectrices médiées par la PCa améliorent la survie cellulaire et peuvent, en fonction du type d'atteinte cellulaire, se manifester par une activité anti-inflammatoire et anti-apoptotique. D'autres facteurs contribuent ensemble à l'activité de la PCa sur les cellules endothéliales : les récepteurs CD11b/CD18, PAR-3, le S1P1 (sphingosine-1-phosphate receptor 1) par exemple ¹³⁹. Ainsi, l'action cytoprotectrice de la PCa, par l'interaction avec son récepteur spécifique EPCR et le PAR-1, peut être schématisée par son impact sur les cibles suivantes :

- la modulation de la régulation des gènes

- la protection du rôle de barrière de l'endothélium
- l'activation du processus anti inflammatoire
- l'activation du système anti apoptotique

Figure 7 Les différentes composantes de la voie de la protéine C



Les trois principales actions de la voie de la protéine C décrites de gauche à droite sont l'activation de la protéine C, la voie anticoagulante de la protéine C et l'action cytoprotectrice de la protéine C ¹³⁹

la modulation de la régulation des gènes par la PCa :

La PCa régule de nombreux gènes directement ou indirectement en étant à l'origine d'une baisse de la régulation des gènes codant pour une activité pro inflammatoire et/ou pro apoptotique. Ces effets passent essentiellement par la voie NF- κ B (nuclear factor-kappa B), une des voies intra cellulaires préférentielles de l'activation par le TNF- α ¹⁴⁰. Cependant, c'est via le même récepteur PAR-1 qu'à la fois la thrombine et la PCa par des effets opposés,

peuvent induire des signaux intracellulaires. Les protéines NF-kB sont des activateurs transcriptionnels présents dans la cellule sous forme de dimères. En l'absence de signaux extracellulaires spécifiques, les dimères NF-kB sont retenus dans le cytoplasme sous forme inactive par leur interaction avec les molécules de la famille IκB. A la suite de diverses stimulations (par le TNF-α notamment), les molécules IκB sont phosphorylées ce qui va avoir pour conséquence de permettre aux dimères NF-kB d'être transportés dans le noyau où ils se fixent sur les promoteurs de leurs gènes cibles ¹⁴¹

les effets sur la barrière endothéliale :

En cas de perte d'intégrité de la barrière endothéliale dans certaines pathologies, il s'en suit une perméabilité endothéliale accrue, une fuite protéique vers la matrice ce qui aggrave les conditions inflammatoires et hémodynamiques ¹⁴². La fixation de la PCa sur le récepteur PAR-1, induit une action sur la sphingosine (SphK-1) qui surexprime la sphingosine-1 phosphate (SIP). Cette dernière active un récepteur SIP1 qui induit des voies de signalisation via la famille Rho et les MAP kinases pour ainsi réduire la perméabilité endothéliale et stabiliser le cytosquelette ¹⁴³.

les effets anti apoptotiques :

Les effets anti apoptotiques de la PCa ont pu être démontrés in vitro comme in vivo ¹⁴⁴. Le signal intracellulaire repose toujours sur l'activation de PAR-1 par la PCa en présence d'EPCR au niveau de la membrane cellulaire, notamment endothéliale. Les signaux induits sont de 2 ordres. Il existe une régulation directe vers les 2 voies de l'apoptose cellulaire intrinsèque et extrinsèque. D'autre part, il existe un effet sur les voies de l'apoptose via l'effet

régulateur de l'expression des gènes, par l'effet sur la voie NF- kB. Sur la voie intrinsèque, la PCa module l'expression des molécules pro apoptotiques comme p53 et Bax et maintient l'effet protecteur anti apoptotique de Bcl-2^{140 145}. La PCa agit également sur la voie extrinsèque des caspases en inhibant les caspases initiatrices (caspases 8 et 9) autant que les caspases (3) effectrices¹⁴⁵

les effets anti inflammatoires :

Les effets anti inflammatoires démontrés pour la PCa concernent les cellules endothéliales et les lignées leucocytaires. Ceci passe essentiellement par l'inhibition de la voie des NF- kB et des cytokines qui en dépendent, via l'activation de PAR-1 et de l'EPCR.¹⁴⁶ Les conséquences en sont essentiellement une diminution de l'expression des médiateurs inflammatoires de l'endothélium ainsi que de l'expression des molécules d'adhésion comme ICAM-1, VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales^{140, 147}. L'EPCR est exprimé sur une bonne partie de la lignée monocyttaire et macrophagique. Par l'activation PCa/PAR, la PCa entraîne une baisse de l'expression des cytokines induites (IL-1 β et TNF-alpha) ainsi que l'inhibition du relargage de chémokines telles que MIP-1 ou MCP-1 par la lignée monocyttaire¹⁴⁸.

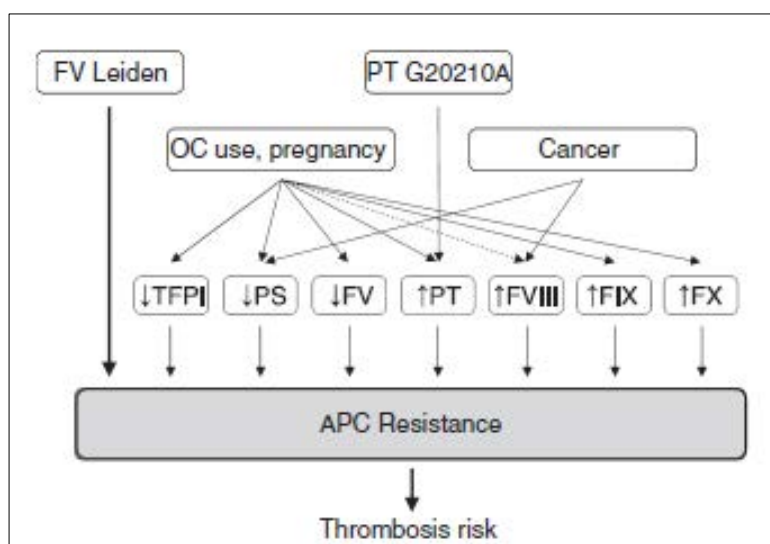
Il a également été mis en évidence un effet inhibiteur de la PCa au niveau de la migration leucocytaire des neutrophiles via des intégrines, cette fois-ci indépendamment de l'EPCR¹⁴⁹.

- Résistance à la PCa rapportée à différentes conditions biologiques et situations cliniques :

La résistance à la protéine C a été initialement mise en évidence chez des familles à risque de thrombose puis relié secondairement à la mutation du facteur V (Arg506Gln) (FV Leiden)¹⁵⁰. Même si le FV Leiden reste une cause majeure de résistance à la protéine C, un certain nombre d'anomalies acquises contribuent à cette résistance avec des conséquences thrombotiques au final. Les mécanismes moléculaires correspondant à la résistance de la protéine C activée liée au facteur V Leiden sont bien établis. Par l'intermédiaire d'une modification Arg506 en Gla, (mutation FV Leiden) le clivage du facteur V par la PCa ne peut survenir, ce qui est nécessaire à la fois pour l'inactivation effective du facteur Va¹⁵¹ et pour l'expression de l'activité co facteur dans l'inactivation du facteur FVIIIa¹⁵². En effet, Thorelli et coll ont constaté qu'en présence de facteur V « normal » c'est à dire sans modification Arg506 en position Gla, de petites quantités de PCa sont nécessaires pour inactiver le FVIIIa. En revanche, des concentrations même relativement élevées de PCA ne suffisent pas en présence d'un FV-506. Ceci suggère que le clivage Arg-506 rend la dégradation du FVIIIa hautement sensibles à la PCa. Mise à part la mutation FV Leiden, d'autres mutations du facteur V peuvent conduire à cette résistance à la PCa (mutation du site de clivage Arg 306 par exemple.),

Les modifications quantitatives et qualitatives des substrats (FVa et FVIIIa) et des cofacteurs (protéine S et FV) de la PCa, aussi bien que les composants des complexes prothrombinases (FXa, prothrombine) et tenases (FIXa et FX) peuvent influencer la réponse du plasma à la PCa. Ci-dessous, Castoldi et al rapportent une série de facteurs procoagulants dont les variations peuvent déterminer une résistance à la PCa¹⁵³.

Figure 8 Différentes situations conduisant à une résistance à la protéine C



Mis à part le FV Leiden, d'autres facteurs génétiques ou acquis contribuent à une résistance à la PCa (RPCa). La plupart d'entre eux agissent en modifiant le taux des facteurs pro et inhibiteurs de la coagulation, ce qui peut-être évalué par le temps de céphaline activée et/ou le potentiel thrombinique. OC : contraceptif oral, TFPI : tissue factor pathway inhibitor, PS : protéine S, PT : prothrombine ¹⁵³

Les effets de l'hyperprothrombinémie sur la RPCa sont dus également à la capacité de la prothrombine à protéger le facteur Va de l'inactivation médiée par la PCa ^{154 155}. Il faut citer le rôle joué par une élévation du taux de FVIII ¹⁵⁶ sur le degré de résistance à la PCa comme celui des facteurs FIX (a) et FX(a). En effet, une élévation du taux des facteurs FIX(a) et FX(a) peut induire une RPCa via une protection accrue de ses cofacteurs FVIIIa et FVa par rapport à l'inactivation médiée par la PCa ^{130 157}.

Il faut également citer le rôle joué par un taux bas de protéine S ^{158 159} et/ou de TFPI sur la RPCa. Contrairement à la protéine S qui agit comme cofacteur de la PC, les effets du TFPI sont moins clairs. Hackeng et coll ont en fait montré que la protéine S est aussi un cofacteur

du TFPI pour l'inhibition du facteur Xa et que les voies de la protéine C et du TFPI travaillent de concert dans la régulation du processus de coagulation^{160 161}. Ainsi, une diminution de l'efficacité du système protéine S/TFPI rend plus difficile le contrôle de la génération de thrombine par la PCa. D'autre part, les travaux de Taube et coll ont contribué à la compréhension du mécanisme qui relie le phénotype PCa résistant et l'activation plaquettaire. Plusieurs études avaient précédemment montré que l'ajout de plaquettes engendre une diminution de la sensibilité à la PCa¹⁶². Pour Camire et coll, les FVa plasmatique et plaquettaire représentent différents substrats pour la PCa, suggérant que les plaquettes soutiennent la génération de thrombine par relargage du FV avec un phénotype PCa résistant et éventuellement en fournissant une surface membranaire qui retarde l'inactivation du cofacteur¹⁶³.

Selon Taube et coll, une RPCa dépendante de l'activation plaquettaire peut être obtenue par une variété d'agonistes plaquettaires. Dans leurs travaux, la réponse au TRAP et au collagène suggère que l'activation plaquettaire *in vivo* est capable de produire une RPCa comme celle rapportée chez des patients présentant une mutation FVR506Q¹⁶². Cela permet de déduire que l'activation plaquettaire sur le site de la lésion endothéliale régule un mécanisme naturel anticoagulant en favorisant la génération de thrombine. Il existe, comme nous le montrent Castoldi et coll, un certain nombre de conditions acquises conduisant à une RPCa. Plusieurs facteurs de risque de thrombose veineuse profonde sont associés par exemple à une RPCa. Il faut citer comme exemple la présence d'anticorps antiphospholipides, une néoplasie, une grossesse, la prise d'une hormonothérapie substitutive ou d'une contraception orale^{164, 165}.

Une RPCa dans le cadre d'une maladie néoplasique est attribuable à ces modifications des facteurs de coagulation et d'inhibition sachant que ces modifications semblent spécifiques à chaque type de néoplasie. Par exemple, les tumeurs solides semblent donner une RPCa par

une augmentation des taux de facteurs procoagulants ¹⁶⁶ alors que les hémopathies malignes engendrent cette RPCa par une diminution de la protéine S ¹⁶⁷.

- Apports de la PCa recombinante en pratique clinique :

L'utilisation de la PCa recombinante humaine (PCRha) en pratique clinique est une suite logique apportée aux propriétés anticoagulantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques rapportées de la PCa. A partir du début des années 2000, la majeure partie des travaux menés sur la PCa humaine recombinante en pratique clinique a été réalisé dans le cadre du sepsis mais aucune dans le cadre de l'insuffisance cardiaque. Au cours du sepsis, il existe une activation systémique de la coagulation dans la microcirculation. Cet état procoagulant est entretenu par une défaillance des systèmes anticoagulants endogènes et une inhibition de la fibrinolyse. Ces éléments contribuent à la coagulation et la formation de microthrombi au détriment d'une lyse physiologique et induisent un défaut de perfusion d'organe. Les cellules endothéliales acquièrent lors du sepsis des propriétés procoagulantes et/ou perdent leurs propriétés anticoagulantes et fibrinolytiques sous l'action des endotoxines et des cytokines pro-inflammatoires ^{168, 169}. Un premier travail réalisé dans un modèle de sepsis sur l'animal a suggéré que la voie de la protéine C protégeait des défaillances polyviscérales et du choc septique ¹⁷⁰. Il a fallu attendre l'étude de phase III (PROWESS : protein C worldwide evaluation in severe sepsis) menés sur 1 690 patients ¹⁷¹ pour évaluer l'efficacité de la Rh PCa dans le sepsis chez l'homme. La mortalité du groupe placebo (30,8 %) était significativement plus élevée que le groupe Rh PCa (24,7 %) avec une tendance non significative en faveur de complications hémorragiques graves ¹⁷¹. Différentes études menées sur le sepsis laissent à penser que la Rh PCa pourrait améliorer la dysfonction vasculaire et endothéliale et la réponse aux catécholamines lors du sepsis ^{172, 173}. Des études très récentes ont ainsi démontré un effet

du traitement par la Rh PCa sur la microcirculation ¹⁷⁴ de même que sur la macro et micro réactivité plaquettaire ¹⁷⁵. Cependant, les différentes études qui ont suivi ont freiné l'enthousiasme généré par la Rh PCa en pratique clinique. L'étude ADDRESS, consacrée à l'administration de Rh PCa chez des patients atteints d'une seule défaillance d'organe ¹⁷⁶, l'étude PROWESS-SHOCK ^{177, 178} et l'étude randomisée APPROOCCHS, n'ont finalement pas montré de différence significative en faveur de l'utilisation de PCRha chez ces patients en choc septique ce qui a conduit à l'arrêt de l'utilisation de la PCRha.¹⁷⁹

Tout ceci traduit la grande difficulté d'adapter les effets de la Rh PCa à partir d'un modèle expérimental à une situation clinique évolutive. L'administration de Rh PCa dans le modèle animal et cellulaire est souvent précoce ce qui favorise les effets anti-inflammatoires de la Rh PCa en diminuant l'apoptose cellulaire à ce niveau et régule les molécules d'adhésion endothéliale. Cet effet protecteur sur l'endothélium est donc différent d'un effet réparateur de la RhPCa sur une atteinte endothéliale effective, fonction de la gravité et du délai de prise en charge du choc septique ¹⁸⁰.

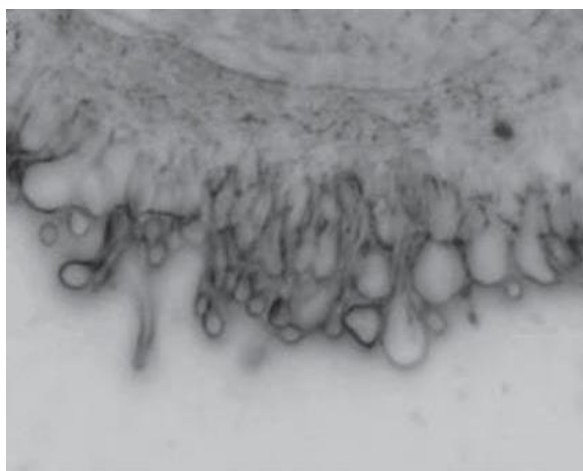
II.2.4.2 Les microparticules

II.2.4.2.1. Introduction

Les microparticules (MPs) représentent une population hétérogène de vésicules inframicrométriques (0,1 à 1µm) libérées en réponse à l'activation ou à l'apoptose cellulaire. La formation de MPs est un processus hautement régulé permettant une libération sélective et importante de contenus cellulaires dans le milieu environnant. ¹⁸¹ La nature des cellules mères ainsi que les facteurs déclenchants à l'origine de la formation des MPs déterminent le nombre, la taille, les compositions antigéniques et les fonctions biologiques des MPs. Le taux de MPs circulantes peut être considéré comme une balance dynamique entre le taux de MPs

libérées par l'activation ou l'apoptose cellulaire et la clairance de ces MPs par la circulation. Chez l'individu sain, la plupart des MPs détectables dans le sang sont dérivés des plaquettes alors que les MPs d'origines endothéliale, leucocytaire et érythrocytaire peuvent être présentes mais seulement en petite quantité^{182 183}. Leur nombre et leur origine diffèrent cependant de manière importante selon les conditions pathologiques.

Figure 9 Aspects de microparticules en microscopie électronique à partir de mégacaryocytes murin¹⁸⁴

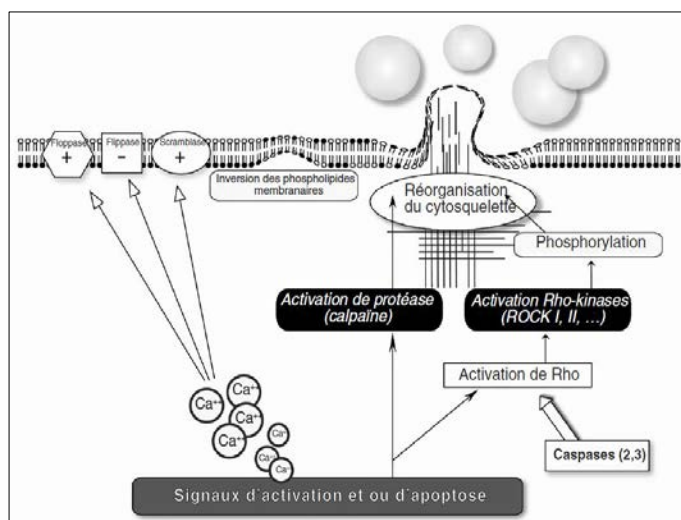


- Genèse et structure des MP :

Les microparticules circulantes (MP) résultent de la microvésiculation (blebbing) des membranes cytoplasmiques cellulaires et sont libérées dans l'espace extracellulaire à la suite de l'activation ou de l'apoptose cellulaire¹⁸⁵. Les MP ne contiennent pas de noyau, et elles se distinguent d'autres éléments circulants comme les exosomes et les corps apoptotiques essentiellement par leur taille et dans une moindre mesure par l'expression de la phosphatidylsérine (PSer)¹⁸⁶. A l'état non activé, la composition et la distribution des phospholipides des membranes cellulaires sont très spécifiques : la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont localisées sur la couche externe de la membrane cellulaire alors que les phospholipides anioniques, la phosphatidyléthanolamine (PE) et la PSer sont retrouvées au

niveau du feuillet interne. Le maintien de cette asymétrie est essentiel et il est assuré par un complexe enzymatique transmembranaire. L'activation et l'apoptose cellulaire vont aboutir à l'augmentation du calcium intra-cytoplasmique qui induit une régulation de l'activité enzymatique des transporteurs phospholipidiques entre les deux feuillets membranaires (flippase ou aminotranslocase, floppase et scramblase) qui conduisent à une externalisation des phospholipides chargés négativement (PSer et PE). L'activation et l'apoptose induisent d'autre part une protéolyse du cytosquelette suite à une activation enzymatique telle que la calpaine et la gelsoline conduisant à un bourgeonnement membranaire et à la formation des MPs cellulaires

Figure 10 Mécanismes impliqués dans la vésiculation membranaire



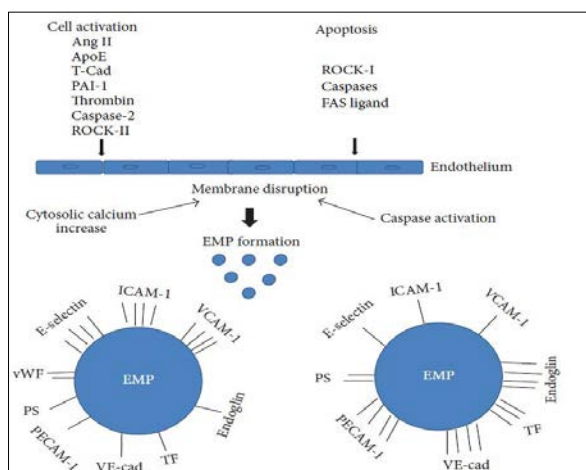
(d'après Daniel L., activité néphrologique 2007, chapitre 4, p37, Flammarion)

-
- Identification des MP

L'expression de la PSer est une caractéristique importante des MP quelle que soit leur origine cellulaire. La fixation spécifique, en présence de calcium de l'annexine V sur la PSer permet

l'analyse des MP *in vitro* et *ex vivo*. Cependant, des MPs exprimant des marqueurs endothéliaux ont été identifiées comme négatives pour la P_{Ser} dans le plasma des patients drépanocytaires¹⁸⁷. Les effets biologiques des MPs dépendent de leur composition protéique et lipidique qui elle-même dépend de la cellule mère et du stimulus lors de leur formation. Toutefois, il a été montré que les MPs issues d'un type cellulaire n'expriment pas tous les marqueurs spécifiques de leur cellule mère¹⁸⁸ ou au contraire les expriment en plus grande quantité¹⁸⁹. Les MPs portant ainsi les antigènes des cellules dont elles proviennent peuvent transférer des molécules de surface à d'autres types cellulaires. La liaison de ces antigènes de surface à leur récepteur spécifique peut activer des voies de signalisation intracellulaire. Les MPs peuvent ainsi provoquer des réactions cellulaires dans le microenvironnement où elles ont été générées. Ainsi, il est possible de citer par exemple l'interaction des MPs plaquettaires avec les monocytes et les cellules endothéliales. D'autre part, les MPs plaquettaires stimulent la prolifération, la survie, l'adhérence, et le chimiotactisme des cellules hématopoïétiques¹⁹⁰. Elles peuvent également transférer les chémokines RANTES (*pour regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) et ainsi attirer les monocytes à la surface de l'endothélium activé¹⁹¹.

Figure 11 Différences dans l'expression antigénique des microparticules



Différences dans l'expression antigénique des MP d'origine endothéliale en fonction de l'activation et de l'apoptose des cellules mères. Les activateurs des cellules endothéliales dont la thrombine provoquent une augmentation du calcium cytosolique qui conduit à la rupture membranaire. La Caspase-2 induit ROCK-II indépendamment de la mort cellulaire. Les inducteurs de l'apoptose incluant ROCK-1(Rho activated kinase), les caspases et le FAS ligand activent les caspases et induisent la rupture membranaire des cellules endothéliales conduisant à la vésiculation et à la formation des MPs endothéliales. (le nombre de barre représente le niveau d'antigène à la surface des MP : 1 barre niveau bas, 4 barres niveau élevé)¹⁹²

II.2.4.2.2. Propriétés des microparticules

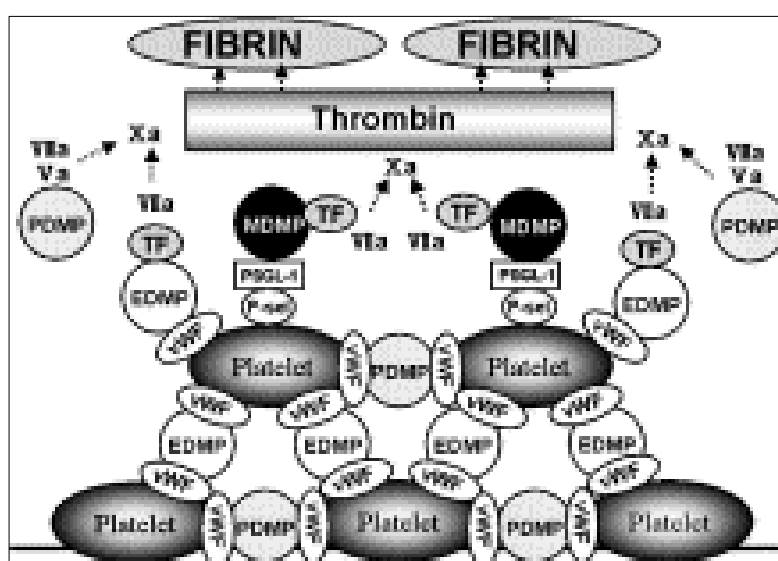
- Propriétés pro coagulantes des microparticules

La membrane cytoplasmique des MPs présente toutes les propriétés pour agir comme support à des réactions de coagulation. Les propriétés procoagulantes des MPs proviennent principalement de l'expression des phospholipides anioniques comme la PSer et du FT, acteurs majeurs du système de coagulation¹⁹³. Durant la formation des MPs, la perte de la distribution asymétrique des phospholipides au niveau membranaire augmente le potentiel procoagulant en facilitant la liaison des facteurs de coagulation Ca⁺ dépendant à la surface de la MP ce qui rend possible la formation des complexes tenase et prothrombinase suivie de la

génération de thrombine¹⁹⁴. Les MPs exprimant à la fois la PSer et le FT auraient le potentiel procoagulant le plus important¹⁹⁵. La principale source de MPs circulantes présentes chez les individus sains est représentée par les MPs plaquettaires. Cependant, les MPs plaquettaires exprimant à la fois la PSer et le FT y sont présentes en quantité infime. Il a été démontré d'autre part que les MPs plaquettaires peuvent également se lier au facteur VIII activé (FVIIIa), cofacteur du complexe enzymatique tenase, qui active le facteur X (FX)¹⁹⁶. Les MPs plaquettaires ont également la capacité de se lier au facteur V activé (FVa) qui se combine avec le FXa pour former le complexe prothrombinase¹⁹⁷. Les MPs plaquettaires ayant la capacité de diffuser dans la circulation, ce processus procoagulant ne reste pas localisé au site initial. Non seulement les MP plaquettaires semblent présenter un pouvoir procoagulant prolongé par rapport aux plaquettes activées mais pour certains auteurs, ce pouvoir procoagulant est nettement plus important de l'ordre de 50 à 100 fois plus élevé¹⁹⁸. L'expression du FT par les MPs plaquettaires est néanmoins controversée et résulterait plutôt de la fusion entre les MPs d'origine monocyttaire TF+ et les plaquettes actives¹⁹⁹. Des données récentes confirment ces résultats, l'acquisition d'une activité de type « FT » dans le sang, en particulier par les neutrophiles, serait sous la dépendance d'un transfert direct de FT depuis les monocytes, probablement de manière « paracrine » par l'intermédiaire de microparticules^{198, 200, 201}. Les MPs endothéliales possèdent également des propriétés procoagulantes de par leur expression de PSer et de FT. L'expression endothéliale du TF a été mis en évidence tant sur des modèles animaux d'endotoxémie que dans le sepsis chez l'homme^{202, 203}. Il a été démontré que les MPs endothéliales expriment aussi le vWF qui joue un rôle dans la formation du clou plaquettaire²⁰⁴. Un taux élevé de MPs endothéliales est observé lors de la rupture de la plaque d'athérome au cours du syndrome coronarien aigu²⁰⁴. Ces résultats indiquent que les MPs sont produites dans la plaque d'athérome et que l'apoptose, qui siège au sein de la plaque d'athérome, joue un rôle important dans

l'amplification des événements thrombotiques lors de la rupture de la plaque via la production de MPs procoagulantes.

Figure 12 Représentation schématique du rôle des MPs dans le développement du thrombus



Différents types de MP sont formés au niveau de la lésion locale. Les MPs d'origine endothéliale (eMPs) et monocyttaire (mMPs) exprimant le TF créent un environnement favorable pour initier et être le support des réactions de coagulation.²⁰⁵

- les propriétés anticoagulantes des MP

Les MPs présentent également des propriétés anticoagulantes principalement basées sur l'expression du TFPI à leur surface. Le complexe TF-FVIIa est régulé par le TFPI qui est lui-même synthétisé par les cellules endothéliales et qui agit contre l'activation inappropriée de la coagulation²⁰⁶. Ainsi, il est possible que le TFPI exprimé par les MPs puisse inhiber les complexes TF-VIIa. Cette expression du TFPI est présente à la surface des MPs d'origine

plaquettaire ²⁰⁷, endothéliale ²⁰⁸, monocytaire ²⁰⁹ et sur les MPs circulantes dans le cadre de l'infarctus du myocarde ²¹⁰. Ainsi, l'équilibre entre TF et TFPI détermine le degré de thrombogénicité et diffère en fonction des situations pathologiques comparés aux sujets sains. Cet équilibre reflète en partie l'état d'hypercoagulabilité et pourrait être intéressant pour identifier le risque thrombotique.

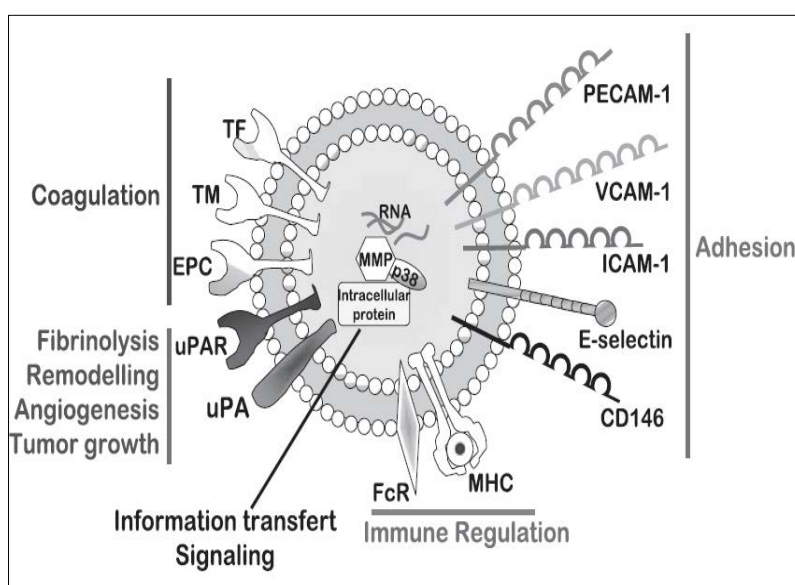
- les propriétés fibrinolytiques des MPs :

L'activité fibrinolytique des MPs participe à la régulation de la balance hémostatique. L'activité fibrinolytique est liée au fait que les MPs sont un support efficace à la génération de plasmine. L'activation du plasminogène est régulée finement par des acteurs inhibiteurs et activateurs (matrice extracellulaire, fibrine..). Deux protéases sériques, l'urokinase (u-PA) et l'activateur du plasminogène sont capables d'activer le plasminogène en plasmine ²¹¹. L'urokinase se lie à un récepteur cellulaire spécifique (CD87, u-PAR) qui est exprimé à la surface des cellules endothéliales, des monocytes des cellules T, des cellules musculaires lisses. Le t-PA est lui synthétisé par des cellules neuronales, des cellules gliales, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. La liaison du t-PA à la fibrine augmente son affinité au plasminogène. Selon Lacroix et coll, l'ensemble du panel moléculaire nécessaire à une génération du plasminogène est présente à la surface des MPs endothéliales et des leucocytes. A l'inverse, les MPs érythrocytaires et plaquettaires seraient dénuées d'une telle activité ¹⁹⁹. La capacité des MPs à générer de la plasmine a été principalement étudiée pour les MPs dérivés des cellules endothéliales. Le modèle initial de MPs a utilisé des cellules endothéliales microvasculaires humaines stimulées par du TNF α pour au final identifier le système uPA/uPAR. L'activité fibrinolytique des MP a ensuite été confirmée in vivo chez les patients présentant un lupus et ceux présentant un purpura thrombocytopenique

²¹²L'endothélium est une des premières cibles des microparticules circulantes. En effet, Barry et coll. ont montré que le fait de transporter de l'acide arachidonique confère aux microparticules la possibilité d'induire la cyclooxygénase-2 (COX-2) et des protéines d'adhésion intercellulaire ²¹³. Les microparticules (MPs) sont une source de phospholipides et donc un substrat pour la phospholipase A2 qui facilite l'agrégation plaquettaire, et peuvent aussi être à l'origine d'une inflammation vasculaire par l'intermédiaire de l'acide lysophosphatidique ²¹⁴. Les microparticules peuvent faciliter le chimiotactisme leucocytaire ou plaquettaire au niveau de l'endothélium, constituant un déclencheur pour la production de cytokines d'origine monocytaire (IL-1 β , IL-8 et TNF- α). La fonction vasculaire en est altérée par un phénomène inflammatoire qui s'amplifie ²¹⁵. Les travaux de Mesri et coll ont montré, à partir de l'incubation dans un milieu de culture de microparticules avec des cellules endothéliales une induction de cytokines mais également de protéines d'adhésion impliquées dans l'interaction des leucocytes avec l'endothélium ²¹⁶. Les MPs peuvent donc être considérées à l'origine et en même temps la conséquence d'une maladie inflammatoire à composante vasculaire. Par exemple, la dysfonction vasculaire dans le choc septique est largement influencée par l'interaction endothélium, plaquettes et leucocytes ²¹⁷. Les MPs qui proviennent de tous ces types de cellules auront un effet direct et indirect sur l'ensemble de la paroi artérielle. Les microparticules produites par l'activation plaquettaire peuvent accroître l'accumulation leucocytaire en exprimant la P-selectine permettant l'adhésion au récepteur PSGL-1 présent à la surface des leucocytes ²¹⁸. Les MPs plaquettaires se liant aux polynucléaires neutrophiles peuvent également augmenter le nombre de neutrophiles et l'activité de phagocytose ²¹⁹. Les MPs leucocytaires activent les cellules endothéliales in vitro, stimulent l'expression de gènes, entraînent un relargage de cytokines inflammatoires comme l'IL6 ou IL-8 et accentuent le rôle des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-

selectine²²⁰. Enfin, il a été montré que les MPs monocytaires peuvent induire une production d'anions superoxyde, un relargage de cytokines et une activation du NF-kB monocytaires²²¹.

Figure 13 Représentation schématique du panel de récepteurs et enzymes exprimés à la surface des MPs



Les MP endothéliales expriment un large panel de récepteurs, d'enzymes et de protéines qui leur confèrent un rôle dans la coagulation, l'inflammation, l'angiogénèse et la régulation immunitaire.²²²

II.2.4.2.3 Etude des microparticules dans l'insuffisance cardiaque

La littérature concernant l'intérêt des MPs dans l'insuffisance cardiaque est relativement limitée. Ces travaux ont essentiellement porté sur le rôle des MPs endothéliales dans cette pathologie. En effet, le taux de MPs endothéliales peut être un témoin de la dysfonction endothéliale, phénomène de survenue précoce dans l'insuffisance cardiaque et qui est corrélé au devenir à long terme de ces patients^{223, 62}. Bulut et coll ont ainsi étudié la présence de cellules endothéliales progénitrices circulantes et de MPs d'origine endothéliales chez des patients présentant une dysfonction ventriculaire gauche d'origine ischémique²²⁴. Ils ont montré une diminution de 25% des cellules endothéliales progénitrices circulantes et une augmentation de 109% des MPs endothéliales CD31+ Annexine + ($p < 0,05$) chez les patients avec dysfonction ventriculaire gauche comparé aux patients présentant une cardiopathie ischémique sans dysfonction ventriculaire et ceci indépendamment d'autres causes d'élévation du taux de microparticules comme le diabète^{193, 225, 226}.

L'intérêt d'utiliser une méthode quantitative comme la cytométrie en flux, pertinente sur le plan physiopathologique, pour déterminer la dysfonction endothéliale chez les patients insuffisants cardiaques a été également avancé par Nozaki et coll²²⁷. Ils ont montré que les patients insuffisants cardiaques avec une classe NYHA élevée ont des taux de MPs d'origine endothéliale élevés reflétant le degré d'altération endothéliale. D'autre part, l'étude du devenir à long terme des patients ayant des taux élevés de MPs d'origine endothéliale montre une évolution péjorative en termes de mortalité et d'événements cardiovasculaires. Ces auteurs présentent ce dosage de MPs endothéliales comme un marqueur indépendant d'événements cardiovasculaires à long terme chez les patients insuffisants cardiaques. Il reste néanmoins des contraintes techniques et de standardisation importantes avant d'en faire un biomarqueur de routine. D'autres auteurs ont étudié la présence de MPs d'autres origines cellulaires comme les MPs plaquettaires et les MPs monocytaires dans ce contexte. Ainsi, Walenta et coll se sont intéressés particulièrement à la cardiomyopathie du peripartum²²⁸ qui évolue souvent vers un

tableau d'insuffisance cardiaque à terme. Elle se caractérise par une absence d'enzymes anti-oxydatives qui conduit au clivage protéolytique de la prolactine produisant une apoptose des cellules endothéliales, une atteinte capillaire et une vasoconstriction. Ces auteurs ont pu montrer que le taux de MPs endothéliales est significativement plus élevé dans cette pathologie par rapport aux groupes de patientes saines en post partum, aux femmes pendant la grossesse et ainsi qu'au groupe témoin de femmes non enceintes. Ce taux de MPs endothéliales est également significativement plus important dans ce contexte par rapport à une étiologie ischémique de cardiomyopathie. En ce qui concerne les MPs plaquettaires et les MPs monocytaires, elles augmentent également largement dans le groupe cardiopathie du peripartum par rapport au groupe de patients ayant une cardiopathie ischémique ou à celui des patientes enceinte sans pathologie cardiaque.

Très peu d'études ont étudié l'apport des microparticules dans l'insuffisance cardiaque aigue. Le travail publié par Montoro-Garcia et coll étudie une catégorie particulière de microparticules : les microparticules de petite taille (inférieur à 0,1 μM) dans le cadre de la cardiopathie ischémique. Les auteurs ont comparé un groupe de patients à la phase aigüe d'une décompensation cardiaque, des patients présentant une insuffisance cardiaque dans un état clinique jugé stable et un dernier groupe de patients présentant une cardiopathie ischémique connue stable. Une quantité élevée de MPs annexine V positive était significativement corrélée au statut fonctionnel des patients (Stade NYHA III et IV) et aux marqueurs d'inflammation (Toll récepteurs-4 et les sous populations de monocytes). Trois mois après la sortie d'hospitalisation des patients, le nombre de MPs annexine V+ était corrélé positivement aux récepteurs d'IL-6, CD163 et CD204.²²⁹

Cependant, aucune de ces études menées dans la cadre de l'insuffisance cardiaque n'a fait le lien jusqu'à présent entre la libération de ces microparticules et la génération de thrombine comme marqueur de l'hypercoagulabilité

III) HYPOTHESES ET OBJECTIFS

L'identification de nouveaux mécanismes physiopathologiques est nécessaire afin d'améliorer le devenir des patients admis pour une insuffisance cardiaque aigüe. Ceci implique un changement de paradigme dans la compréhension de cette affection et la thrombose est une cible d'intérêt. Nous faisons l'hypothèse que les patients à la phase aigüe d'une décompensation cardiaque présente un phénotype hypercoagulable se caractérisant par une modification des paramètres de génération de thrombine par rapport à une population de sujets contrôles.

Plusieurs mécanismes contribuent à cet état d'hypercoagulation des patients insuffisants cardiaques comme l'augmentation des facteurs procoagulants solubles, la dysfonction endothéliale, l'inflammation, l'activation des récepteurs PAR⁵¹.

Un autre de ces mécanismes physiopathologiques conduisant à l'hypercoagulabilité de ces patients pourrait être une altération de l'action de la voie de la protéine C à réguler la génération de thrombine. La thrombine semble être une cible d'intérêt car il s'agit d'une enzyme clé de la cascade de coagulation qui combine les fonctions procoagulantes et anticoagulantes à travers le contrôle de l'activité de cette cascade. Par son interaction avec des récepteurs cellulaires comme la thrombomoduline ou les récepteurs PAR, la thrombine a également des effets délétères sur le système vasculaire^{230, 231}.

L'objectif de ce travail est d'établir l'état de coagulabilité des patients par la mesure de la cinétique de formation et d'inactivation de cette thrombine en utilisant une méthode intégrative, la thrombinographie et d'évaluer l'impact sur cette génération de thrombine sur le système anticoagulant de la protéine C activée. En effet, la thrombinographie permet d'étudier les effets des systèmes anticoagulants dont l'action est prépondérante après la phase de formation du caillot.

Nous étudierons la contribution des microparticules et des marqueurs solubles de dysfonction endothéliale dans le phénotype procoagulant de ces patients et déterminerons si l'altération de la régulation de la génération de thrombine par la voie de la protéine C pourrait être un mécanisme contribuant à l'hypercoagulabilité des patients insuffisants cardiaques.

IV. PATIENTS ET METHODES

IV.1. Sélection des patients

Nous avons inclus dans notre étude prospective 34 patients admis dans le service de cardiologie du CHU de Nancy pour un tableau clinique de décompensation cardiaque aiguë.

Ces patients présentent tous à l'admission une dyspnée de classe NYHA III et IV. La définition de l'insuffisance cardiaque aiguë retenue est celle des recommandations de l'ESC : un début/progression rapide des signes d'insuffisance cardiaque secondaire à une fonction cardiaque systolique/diastolique anormale attestée par une échocardiographie et nécessitant une hospitalisation.¹⁹

Les prélèvements sanguins ont été effectués à l'entrée des patients en hospitalisation, en fin de séjour et au moins six semaines après la sortie d'hospitalisation dans un état jugé cliniquement stable.

La prise en charge médicale, les bilans paracliniques durant l'hospitalisation et le traitement de sortie n'ont pas été modifiés pour ce protocole. Le bilan paraclinique comprend à la fois une surveillance biologique (hémogramme, fonction rénale, recherche de troubles hydro électrolytiques, syndrome inflammatoire avec le dosage de la protéine C réactive, le dosage du BNP brain natriuretic peptid, une crase sanguine à l'entrée TQ TCA , un bilan hépatique) et une évaluation échocardiographique (mesure des volumes ventriculaires en diastole et systole, détermination de la fraction d'éjection ventriculaire gauche par méthode de Simpson, recherche et évaluation des valvulopathies, évaluation des pressions de remplissage avec mesure de la Pression artérielle pulmonaire systolique). Dans certain cas, les patients ont pu bénéficier d'un contrôle coronarographique à titre étiologique sans que cela conduise à un geste d'angioplastie ou à une modification du traitement.

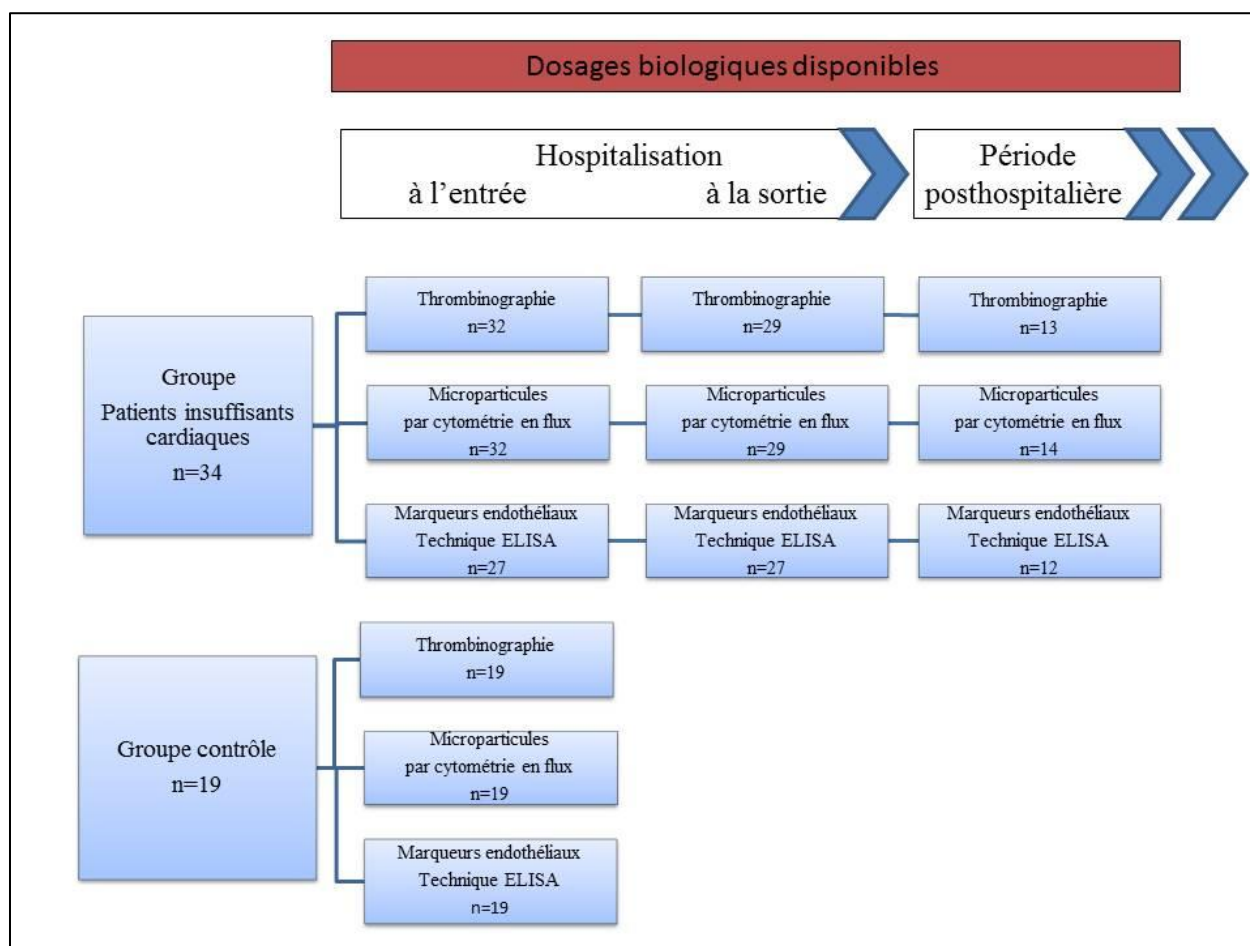
Le traitement de sortie correspond à celui préconisé par les recommandations de l'ESC ¹⁹ avec des doses durant l'hospitalisation en fonction de la tolérance biologique et clinique des patients.

Groupe contrôle

Le groupe contrôle (n=19) est constitué de patients admis dans le service pour un bilan cardiologique programmé ayant une fonction ventriculaire préservée et pas d'antécédent d'insuffisance cardiaque clinique. Il s'agit, dans la majeure partie des cas, d'un bilan coronarographique programmé révélant un réseau artériel normal ou sans lésion significative, ou une stabilité des données, d'un bilan de malaise ou de syncope. Ce groupe contrôle est similaire au groupe de patients insuffisants cardiaques en terme de comorbidités, d'âge, de facteurs de risque et de traitement au long cours.

Les critères d'exclusion pour ces deux groupes sont les suivants : toute maladie inflammatoire ou infectieuse, néoplasie, insuffisance rénale avec une créatininémie > 200 µmol/l, hospitalisation motivée par un syndrome coronaire aigu, prise de corticoïdes ou toute autre pathologie nécessitant une anticoagulation à dose curative durant cette hospitalisation.

Figure 14 Schéma général de l'étude



n correspond au nombre de patients pour lesquels le dosage correspondant a été effectué ou est interprétable

IV.2. Méthodes

IV.2.1. Recueil des échantillons biologiques

Les prélèvements sanguins ont été effectués avec des seringues de type Monovette® (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) contenant 1/10 volume de 0.106 M de citrate de sodium.

Toutes les analyses sur sang frais ont été réalisées dans les 2 h qui suivent le prélèvement.

Le plasma riche en plaquettes (PRP) est obtenu après centrifugation à 190 g de 10 min à 20°C.

Le PRP ainsi obtenu est ajusté à 150 G/L en y ajoutant du plasma pauvre en plaquettes (PPP) obtenu après centrifugation du plasma restant à 1750g pendant 10 min à 20°C.

On obtient du plasma déplété en plaquettes (PDP) après centrifugation du PPP à 13000 G pendant 30 min à 4°C qui est ensuite congelé à -80°C. Les analyses sur PDP ont été effectuées secondairement après décongélation pendant 15 mn à 37°C.

Pour la quantification et la caractérisation des microparticules, le sang a été centrifugé à 2 reprises à 2500 G pendant 15 min, et le plasma ainsi recueilli a été congelé à -80°C pour des analyses ultérieures.

IV.2.2. la thrombinographie

La mesure de la génération de thrombine consiste à mesurer, dans un plasma recalcifié, la thrombine générée au cours du temps par l'intermédiaire d'un substrat fluorigène. La cinétique de la génération de thrombine est réalisée à 37°C par un fluorimètre (Fluoroskan Ascent, ThermoLabsystems®, Helsinki, Finland) avec le logiciel dédié Thrombinoscope (BV, Synapse®, Maastricht, Pays-Bas) comme cela a été décrit précédemment²³². Un calibrant (mélange d'un complexe α 2-macroglobuline/thrombine humaine ajusté à une activité connue d'environ 600 nM avec de l'antithrombine 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 à fond rond (Greiner Bio-one Ltd®, Stonehouse, UK). La réaction est obtenue en déposant dans les puits 10 μ L de tampon HBS pH 7,35 constitué d'HEPES ((N-[2-hydroxyethyl] pipérazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) 20 mM, de NaCl 140 mM), de facteur tissulaire recombinant (h-rTF, Innovin®, Dade Behring) à une concentration finale de 0.5 pM, 10 μ l de

PCa (produite dans notre laboratoire) ou d'HBS en fonction du puit étudié et 80 µl de PRP frais ajusté à 150 G/l.

Une double analyse contenant 20 µl de calibrant (Synapse B.V.®, Maastricht, Pays-Bas) et 80 µl de spécimens plasmatiques est effectuée dans la plaque pour chaque plasma étudié. La plaque est placée dans le fluorimètre 10 min avant l'addition par cet appareil de 50 µl d'un mélange de substrat fluorigène (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem®) à 2,5 mM en HEPES 20 mM, pH 7,35, contenant de la BSA à 60 g/l et de CaCl₂ 100 mM.

La fluorescence obtenue est enregistrée avec une longueur d'onde d'excitation de 390 nm, une longueur d'onde d'émission de 460 nm et un intervalle de mesure de 15 secondes.

Pour effectuer la mesure de génération de thrombine en PDP, nous avons décidé de diminuer le volume utilisé de réactifs et de PDP par deux afin d'optimiser au mieux la quantité de PDP disponible pour toutes ces analyses.

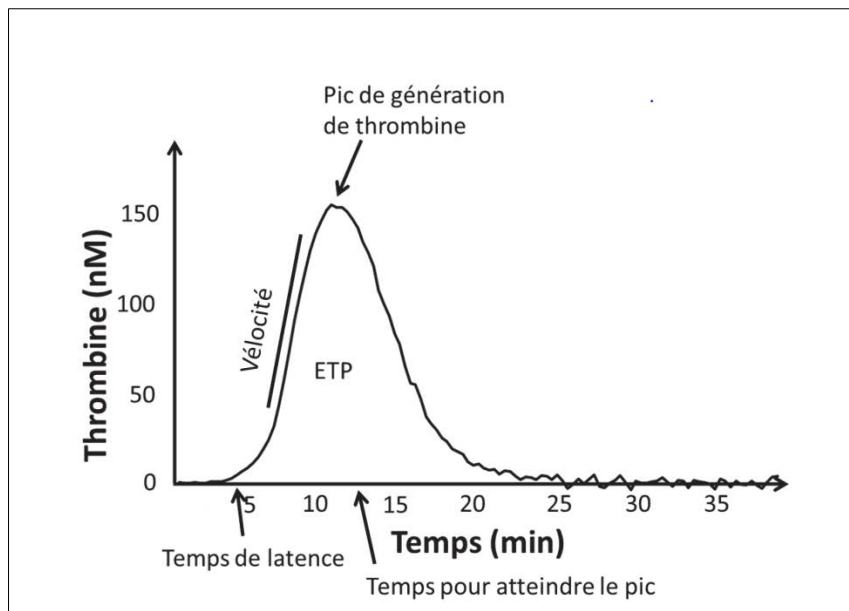
Lorsque la génération de thrombine est effectuée avec du PDP, un mélange de 5 µl de vésicules phospholipides: phosphatidylcholine (PC)/ phosphatidylserine (PS)/ phosphatidylethanolamine (PE); (PC/PS/PE, 60/20/20, mole %) à une concentration finale de 4 µM est ajoutée, 1 pM de facteur tissulaire recombinant (h-rTF, Innovin®, Dade Behring), 5 µl de PCa ou d'HBS et 40 µl de PDP.

Les courbes de génération de thrombine sont enregistrées en PRP en l'absence puis en présence de PCa recombinante à différentes concentrations (6.7, 13.9, 25 and 65 nM) et en PDP en l'absence puis présence de PCa recombinante à différentes concentrations (0.85, 1.7, 6.7 and 13.9 nM)²³³.

Plusieurs paramètres caractérisent les courbes de génération de thrombine ou thrombinogramme. Il y a ceux donné directement par le thrombinogramme, comme le temps de latence (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. La concentration de PCa permettant d'inhiber la production thrombinique correspond à l'IC50PCa.

Figure 15 Paramètres de génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes



Expression des différents paramètres de génération de thrombine mesurés en thrombinogénèse ETP : endogenous thrombin potential

IV.2.3. les microparticules

a) Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux repose sur l'étude précise de cellules isolées. Les cellules passent une à une devant un détecteur grâce à un flux liquide à grande vitesse (30 km/h). Un rayon laser est alors projeté sur ces cellules et c'est grâce à un système électronique que les données sont converties en signaux délivrés par l'ordinateur. Ce système électronique est composé d'un photomultiplicateur qui capte la lumière émise, d'un digitaliseur qui transforme l'énergie lumineuse en signaux électriques puis numérique et, ces signaux sont ensuite amplifiés.

Les paramètres analysés sont la diffusion lumineuse qui permet de déterminer le forward scatter (FS) et le side scatter (SS). Le FS correspond à la lumière diffractée sous un petit angle (1 à 10°) et il est relatif à la taille des cellules, le SS correspond à la lumière collectée à 90° de l'axe du laser et il est relatif à la granularité des cellules. Le deuxième paramètre analysé par le cytomètre est la fluorescence, ce qui permet de pouvoir marquer les cellules avec un fluorochrome spécifique et ainsi de différencier les différentes populations de cellules.

b) Quantification des microparticules

Pour la quantification des MP, une étape préalable de calibration de l'appareil est nécessaire. Elle consiste à analyser des microbilles (Megamix®, Beckman) de tailles connues (0,3 µm, 0,9 µm et 3 µm), ensuite, l'appareil est paramétré pour ne compter que les particules entre 0,1 µm et 1 µm. Pour quantifier les MP, un volume de 20 µL de MP (diluée dans l'HBS) est ajouté à 300 µL de micro-billes fluorescentes (Flowcount™ Fluorospheres ® Beckman) de concentration connue. Le tout est agité puis placé dans le cytomètre (Gallios ®, Beckman Coulter, Villepinte, France) afin de réaliser la quantification.

c) Caractérisation des microparticules

Les anticorps fluorescents suivants ont été utilisés pour la réalisation d'un marquage multiples de ces microparticules : CD41-phycoerythrin (CD41-PE), CD144-PE, CD14-PE et allophycocyanin-endothelial protein C receptor (EPCR) proviennent de BD Pharmagen®, l'anticorps anti facteur

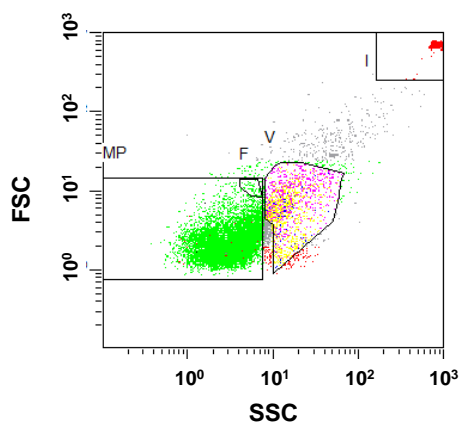
tissulaire (clone TF9-10H10, allophycocyanin-TF) de Biotechne ® et de l'annexine V-FITC de Fisher Scientific®.

Ces anticorps fluorescents permettent le marquage des microparticules d'origine plaquettaire (CD 41-PE), endothéliale (CD144-PE) et monocytaire (CD14-PE). Un marquage supplémentaire de ces microparticules est effectué en utilisant les anticorps allophycocyanin- EPCR et allophycocyanin-TF ainsi qu'un marquage par annexine V-FITC qui va se lier à la Pser.

Le comptage des MPs s'effectue en cytométrie en flux en utilisant la procédure standardisée décrite précédemment ²³⁴ : 20 µL de plasma sont incubés avec une concentration optimale d'anticorps spécifique et 10µL d'annexine V-FITC. Les tubes sont alors analysés dans le cytomètre GALLIOS 3-lasers instrument (Beckman-Coulter®, Miami, FL, USA) pour effectuer le compte de MP. (événements par µL).

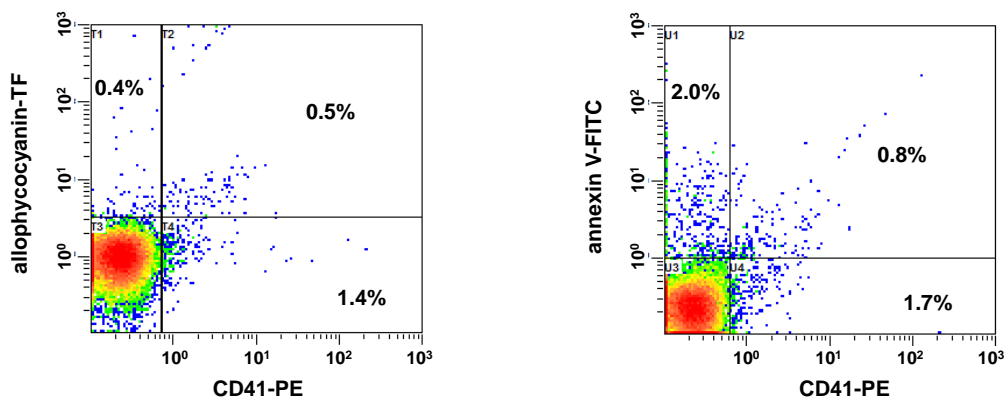
Figure 16 Exemple de cytogrammes obtenus chez un patient insuffisant cardiaque

Sélection des microparticules

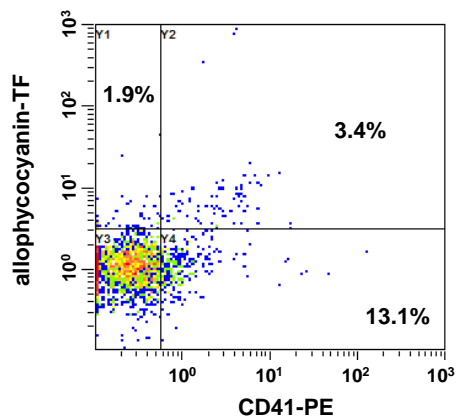


MP = fenêtre des microparticules < 1 μm ; V = fenêtre de particules > 1 μm
I = billes de calibration ; F = billes de 0,9 μm

Quantification des microparticules positives pour l'annexine V ou le facteur tissulaire



Quantification des microparticules positives pour l'annexine V et le facteur tissulaire par sélection préalable des microparticules annexine V positives



IV.2.4. Les marqueurs solubles endothéliaux.

La thrombomoduline soluble, l'EPCR soluble, le TFPI (tissue factor pathway inhibitor) et le facteur de von Willebrand sont mesurés en PDP par technique ELISA. Chacun des dosages suivants a été réalisé selon les instructions du fournisseur.

Les différentes trousse utilisées sont : -

- le coffret ASSERACHROM Free TFPI (Assechrom, Diagnostica Stago™, Asnières, France) pour le dosage de l'activité du TFPI. Pour ce dosage les dilutions ont été augmentées à 1/50 en tampon de dilution.
- le coffret ASSERACHROM VWF® : Ag (Assechrom, Diagnostica Stago™, Asnières, France) pour la forme antigénique du vWF.
- le kit Asserachrom sEPCR (Assechrom, Diagnostica Stago™, Asnières, France) pour le dosage de l'EPCR soluble.
- le kit Quantikine Elisa Human Thrombomodulin/BDCA-3 (Bio-technique) pour le dosage antigénique de la thrombomoduline.

IV. 2.5. Evaluation de la réactivité plaquettaire

L'étude de l'agrégation plaquettaire a été effectuée grâce à un thrombo agrégomètre SD Innovation (Frouard). Cette méthode nécessite l'utilisation du PRP, avec au préalable un comptage effectué pour ajuster le PRP à une concentration de 300 G/L. Elle permet de quantifier l'agrégation des plaquettes en mesurant la transmission de lumière à travers le PRP. La transmission de lumière est réglée à 100 % avec du PDP et à 0 % avec le PRP non activé.

La transmission de lumière est mesurée en continu et elle 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 mesure de l'agrégation plaquettaire a été réalisée dans des cuves contenant chacune 300 μ L de PRP. Deux agonistes ont été utilisés, le collagène à 2, 5 et 10 μ g/mL et l'ADP à 2,5 et 10 μ M (SD Innovation, 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.

Le protocole de l'étude a été validé par le comité de protection des personnes et la direction de recherche clinique le 06 mai 2014 dans le cadre d'un projet CPRC 2012.

V. ANALYSE STATISTIQUE

Les différentes analyses ont été réalisées à l'aide du programme statistique (SAS software R9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Le degré de significativité retenu correspond à une valeur $p < 0.05$.

Les variables continues sont décrites sous forme de moyenne et de déviation standard (moyenne \pm déviation standard) et également sous forme de moyenne et erreur standard de moyenne (moyenne \pm erreur standard de moyenne).

Les valeurs catégorielles sont présentées sous forme de fréquence et % (n [%]).

En fonction d'une distribution de type normale, les comparaisons simples et les corrélations entre variables continues sont obtenues en utilisant respectivement les tests non paramétriques de Mann-Whitney et Spearman.

Les valeurs catégorielles ont été analysées en utilisant test du Chi 2 et le test de Fischer.

Dans le groupe des patients insuffisants cardiaques, les comparaisons entre les différents temps d'analyse (groupe Ad, Sor, PostH) ont été effectuées par un test ANOVA avec la période d'analyse comme facteur fixe ; les comparaisons post-hoc ont été ajustées par méthode de Scheffe. Les comparaisons entre les groupes Ad et Sor d'une part et le groupe contrôle groupe (CT) d'autre part ont été effectuées par le test non-paramétrique de Mann-Whitney, en ajustant le seuil de significativité à $p < 0.025$ pour les tests multiples. Les analyses de corrélation ont été obtenues par un test de Spearman.

VI RESULTATS

Les caractéristiques de la population étudiée sont présentées dans le tableau 1.

Le groupe de patients étudiés est composé de 34 patients (11 femmes, âge moyen 72 ± 16 ans, valeurs extrêmes : 19 et 86 ans) hospitalisés pour une insuffisance cardiaque aigüe. Tous les patients présentent à l'admission une dyspnée de stade NYHA ≥ 3 . Il s'agit d'une décompensation cardiaque aigüe dans le cadre d'une cardiopathie d'origine valvulaire dans 34% des cas et d'origine ischémique (en dehors de toute forme de syndrome coronaire aigüe) dans 38% des cas. Dix-neuf sujets (5 femmes, âge moyen 65 ± 17 ans, valeurs extrêmes : 19 à 86 ans) sans antécédent d'épisode d'insuffisance cardiaque clinique ni de dysfonction ventriculaire gauche composent le groupe contrôle.

Les deux groupes sont comparables sur les paramètres suivants : âge, sexe, facteurs de risques et co morbidités. Le traitement pharmacologique des patients ne diffère pas significativement entre ces deux groupes hormis une administration plus importante de diurétiques dans le groupe insuffisance cardiaque ($p < 0,0001$). Dans notre étude, 24 patients insuffisants cardiaques à l'admission sont sous antiagrégants plaquettaires (aspirine et/ou clopidogrel). Parmi ceux-ci, nous avons répertorié sept patients initialement sous double anti agrégation plaquettaire (clopidogrel et aspirine) et dont le traitement a ensuite été modifié durant l'hospitalisation avec arrêt d'un des deux antiagrégants. Une antiagrégation par aspirine a été instaurée en pré hospitalier ou à l'admission à 7 autres patients. Une monothérapie antiagrégante par aspirine a été instaurée en pré hospitalier ou à l'admission à 7 autres patients, traitement également arrêté pendant l'hospitalisation. Il s'agissait dans tous les cas d'un traitement antiplaquettaire inapproprié pour un diagnostic de syndrome coronaire aigüe initial puis infirmé pendant l'hospitalisation dans le service.

Tableau 4 Caractéristiques de la population

	Patients	Groupe Contrôle	valeur p
	moyenne \pm SD ou n (%) n=34	moyenne \pm SD ou n (%) n=19	
- Sexe masculin	23 (68%)	14 (74%)	1.00
- Age (ans)	72 \pm 16	65 \pm 17	0.38
Facteurs de risque			
- Hypertension	27 (79%)	11 (58%)	0.13
- Diabète	15 (44%)	7 (37%)	0.95
- Tabac	7 (21%)	6 (32%)	1.00
Antécédents			
- Cardiopathie valvulaire	8 (34%)	3 (16%)	1.00
- Cardiopathie ischémique	13 (38%)	9 (47%)	0.80
- Défibrillateur implantable	3 (9%)	0 (0%)	0.17
- Resynchronisation cardiaque	4 (12%)	0 (0%)	-
- Insuffisance rénale chronique	9 (27%)	3 (16%)	1.00
Traitement			
- Beta-bloquant	27 (79%)	13 (68%)	0.42
- Inhibiteur enzyme de conversion	29 (85%)	12 (63%)	0.098
- Diurétique	32 (94%)	3 (16%)	< 0.0001
- Statine	22 (65%)	13 (68%)	0.70
- thérapie antiagrégante (aspirine/ et :ou clopidogrel)	24 (71%)	15 (79%)	0.70
Paramètres échocardiographiques			
- VTDTV (ml)	132 \pm 51	92 \pm 9	0.034
- VTSTV (ml)	82 \pm 39	58 \pm 9	0.11
- FEVG (%)	38 \pm 13	58 \pm 3	< 0.0001
- PAPS (mmHg)	45 \pm 10	33 \pm 4	0.0004
Biologie à l'admission			
BNP (ng/l)	1432 \pm 1468	96 \pm 11	< 0.0001
Créatininémie (mg/l)	13.2 \pm 5.9	11 \pm 3	0.64
Clairance créatinine (ml/min/1.73m ²)	55 \pm 19	70 \pm 18	0.34
Glycémie (g/l)	1.18 \pm 0.36	1.04 \pm 0.22	0.25
PCR (mg/l)	14.9 \pm 10.6	5.0 \pm 3.1	0.001
ASAT (UI/l)	36 \pm 34	19 \pm 6	0.30
ALAT (UI/l)	38 \pm 33	16 \pm 7	0.080

VTDTV : volume télédiastolique du ventricule gauche VTSTV : volume télésystolique du ventricule gauche FEVG : fraction d'éjection ventriculaire gauche PAPS : pression artérielle pulmonaire systolique BNP : brain natriuretic peptide PCR : protéine C réactive
Transaminases : ALAT ASAT ;transaminases

Dans le cadre du suivi, nous avons répertorié cinq décès dans le groupe des patients insuffisance cardiaque aigue survenus dans les trois mois après la sortie d'hospitalisation, patients qui n'ont pu bénéficier d'un suivi biologique.

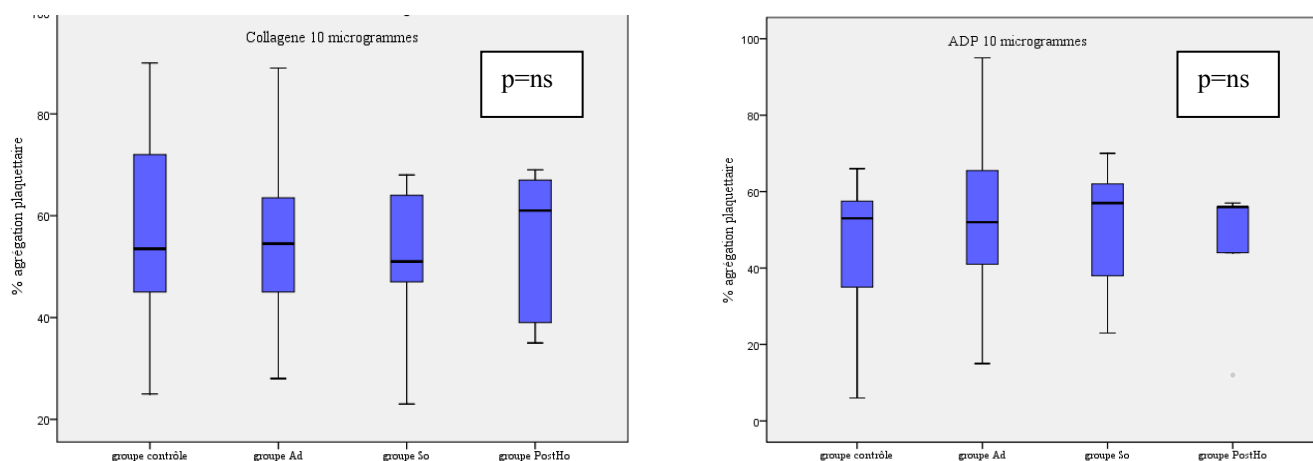
Les patients insuffisants cardiaques présentent une fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) diminuée ($p < 0,0001$), un volume télédiastolique ventriculaire gauche ($p < 0,03$) et une pression artérielle pulmonaire systolique augmentée ($p = 0,004$) par rapport aux patients du groupe contrôle. Les dosages du BNP (brain natriuretic peptid) ($p < 0,0001$) et de la protéine C réactive ($p = 0,001$) sont également significativement augmentés dans le groupe des patients insuffisants cardiaques par rapport au groupe contrôle.

La réactivité plaquettaire

Quinze patients insuffisants cardiaques seulement ont pu bénéficier d'une évaluation de l'agrégation plaquettaire à l'entrée, 9 à la sortie d'hospitalisation et 6 après la période hospitalière. Ces données ont été comparées aux résultats obtenus chez 8 individus dans le groupe contrôle (figure 17). La comparaison entre les différents groupes ne montre aucune différence significative quel que soit l'agoniste utilisée. Aucune différence significative n'a été observée

Le faible nombre de patients ainsi que l'hétérogénéité et les modifications dans la prescription du traitement antiplaquettaire durant la prise en charge initiale rendent cependant cette analyse difficile.

Figure 17 Evaluation de l'agrégation plaquettaire dans les différents groupes étudiés



Evaluation de l'agrégation plaquettaire à 6 minutes en fonction de l'agoniste (Collagène à dose de 10 microgrammes et ADP à dose de 10 μ M)

Les marqueurs solubles de dysfonction endothéliale sont élevés chez les patients insuffisants cardiaques

Nous avons déterminé si l'altération endothéliale chez les patients insuffisants cardiaques pouvait induire une libération plasmatique de facteurs endothéliaux pouvant interférer avec des réactions procoagulantes et des voies anticoagulantes.

Comparée au groupe contrôle, les quantités d'EPCR soluble (groupe Ad: 245 ± 83 vs groupe CT: 171 ± 76 , $p = 0.005$), de thrombomoduline soluble (groupe Ad: 284 ± 100 vs groupe CT: 158 ± 40 , $p < 0.0001$), de facteur de von Willebrand (groupe Ad: 616 ± 296 vs groupe CT: 357 ± 117 , $p = 0.001$) et de TFPI soluble (groupe Ad: 13.9 ± 4.1 vs groupe CT: 10.9 ± 2.9 , $p = 0.011$) sont significativement plus élevées chez les patients insuffisants cardiaques à l'admission

(tableau 5). L'augmentation de ces facteurs endothéliaux persiste durant la période d'hospitalisation puis s'estompe lors de la période post hospitalière. Aucune différence significative n'est retrouvée entre les patients insuffisants cardiaques lors de la période posthospitalière et le groupe contrôle.

Tableau 5 Les marqueurs circulants d'activation endothéliale

	Groupe contrôle (CT) n = 19	Groupe admission (Ad) n = 27	Groupe Sortie d'hospitalisation (Sor) n= 27	Groupe Phase posthospitalière (PostHo) n = 12
EPCR soluble (ng/mL)	171 ± 76	245 ± 83 ‡†	240±16 ‡§	169 ± 46
TM soluble (pg/mL)	158 ± 40	284 ± 100 ‡†	269±21 ‡§	146 ± 27
vWF (%)	357 ± 117	616 ± 296 ‡†	534±42 ‡§	318 ± 71
TFPI (ng/mL)	11 ± 3	14 ± 4 †	12.8±1	12.4 ± 2

Valeurs exprimées en moyenne ± SEM. EPCR signifie endothelial protein C receptor; TM, thrombomoduline, vWF, von Willebrand factor, TFPI, tissue factor pathway inhibitor;

Valeurs p : * Ad vs. Sor: p<0.05, ‡ Ad. vs. PostHo: p<0.05, § Sor. vs. PostHo: p<0.05, † Ad. vs. CT: p<0.05, # PostHo. vs. CT: p<0.05

Le nombre de microparticules procoagulantes est élevé chez les patients insuffisants cardiaques à l'admission

La seconde partie de notre travail concerne l'analyse des microparticules circulantes (Mps) par cytométrie en flux que nous avons effectué dans le groupe contrôle et chez les patients insuffisants cardiaques aux différents temps du suivi. En effet, l'activation de l'endothélium conduit à une libération de microparticules et stimulent également la formation de microparticules dérivées des plaquettes et des monocytes.

Il a déjà été décrit que l'activité procoagulante des microparticules est lié au potentiel phospholipidique caractérisé par la liaison annexine V (annV) et à la présence de FT.

Nous avons ainsi déterminé la concentration (nombre/ μ l) des MPs AnnV⁺ et /ou FT⁺ d'origine plaquettaire (pMP), endothéliale (eMP) et monocyttaire (mMP) dans les deux groupes (tableau 6).

Comparée au groupe contrôle, la concentration en eMPs AnnV⁺ était significativement plus élevée chez les patients insuffisants cardiaques à l'admission. La proportion d'eMPs AnnV⁺ par rapport au nombre total d'eMPs passe de 11% dans le groupe contrôle à 29% dans le groupe de patients insuffisants cardiaques à l'admission. Des concentrations plus élevées en eMPs FT⁺ et mMPs FT⁺ sont également présentes dans le groupe des patients insuffisants cardiaques à l'admission de même que la concentration totale en MPs FT⁺ toutes origines confondues (groupe Ad : 2309 \pm 694 vs groupe CT: 466 \pm 11 / μ L, p<0,002). La proportion d'eMPs FT⁺ par rapport au nombre total d'eMPs passe de 13% dans le groupe contrôle à 59% dans le groupe de patients insuffisants cardiaques à l'admission.

La concentration totale de MPs AnnV⁺ FT⁺ est aussi significativement plus élevée dans le groupe de patients insuffisants cardiaques à l'admission comparé au groupe contrôle (Ad 638±122 vs CT 174±140, p<0,002).

Nous avons aussi quantifié le nombre de microparticules dans le groupe insuffisants cardiaques au cours du suivi. Comparativement à l'admission, la concentration d'eMPs AnnV⁺ diminue significativement durant l'hospitalisation et cette diminution se poursuit après la sortie d'hospitalisation.

La quantité totale de MPs FT, quelle que soit l'origine, était significativement diminuée chez les patients insuffisants cardiaques après la sortie d'hospitalisation comparée à l'admission (postHo) 389 ±345 vs Ad 2309 ±694 /μL, p<0,008).

La figure 18 représente l'analyse par cytométrie en flux (fluorescence tri cellulaire) des microparticules en fonction de leur origine cellulaire et du double marquage par annexine et par le facteur tissulaire chez les patients insuffisants cardiaques aux différents temps d'analyse comparée au groupe contrôle. Malgré la variabilité inter-individuelle (Figure 16A-C), des concentrations significativement plus élevées d'eMPs annV⁺ FT⁺ et de mMPs annV⁺ FT⁺ sont observées chez les patients insuffisants cardiaques à l'admission comparé à la période posthospitalière. Il existe également une tendance à des concentrations plus élevées de pMP annexine⁺ FT⁺ chez les patients insuffisants cardiaques à l'admission comparativement à la période posthospitalière sans atteindre une différence statistique (p=0,051).

Enfin, les concentrations en eMPs annV⁺ et FT⁺ de même que les concentrations mMPs AnnV⁺/FT⁺ restent significativement plus élevées chez les patients insuffisants cardiaques lors de la période posthospitalière par rapport à celles du groupe contrôle.

La dysfonction endothéliale peut également être à l'origine de la libération d'eMPs présentant un potentiel anticoagulant, lesquelles par leur action anticoagulante (eMPs EPCR+), pourrait

contrebalancer l'activité procoagulante des eMPs AnnV⁺ et/ou FT⁺. Ainsi, nous avons évalué la concentration des eMps EPCR⁺ : celle-ci est significativement augmentée pendant l'hospitalisation par rapport à la période post hospitalière.

Tableau 6 Les microparticules procoagulantes augmentent dans l'insuffisance cardiaque aiguë

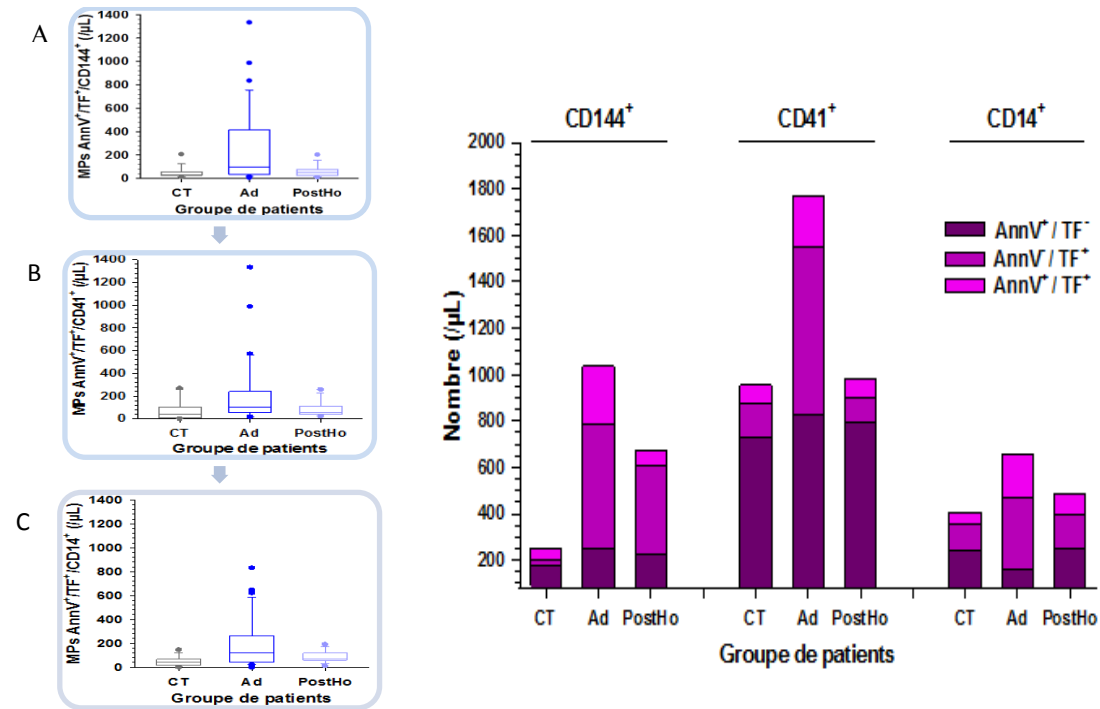
	Groupe contrôle (CT)	Groupe admission (Ad)	Groupe hospitalisation (Sor)	Sortie Groupe posthospitalière (PostHo)	Période
	n = 19	n = 32	n = 29	n = 14	
Microparticules d'origine endothéliale (CD144+)					
AnnV ⁺ /CD144 ⁺	63 ± 13	333 ± 57 * ‡ †	172 ± 20	157 ± 26 #	
TF ⁺ /CD144 ⁺	79 ± 9	784 ± 474 ‡ †	308 ± 350	205 ± 571 #	
AnnV ⁺ /TF ⁺ /CD144 ⁺	50 ± 11	252 ± 56 ‡ †	289 ± 27	66 ± 13	
EPCR ⁺ /CD144 ⁺	105 ± 11	126 ± 27	121 ± 21	101 ± 18	
AnnV ⁺ /EPCR ⁺ /CD144 ⁺	81 ± 12	114 ± 26 ‡	106 ± 20 §	59 ± 8	
Microparticules d'origine plaquettaire (CD41+)					
AnnV ⁺ /CD41 ⁺	304 ± 45	805 ± 208	463 ± 108	485 ± 177	
FT ⁺ /CD41 ⁺	223 ± 30	938 ± 439	317 ± 82	175 ± 26	
AnnV ⁺ /TF ⁺ /CD41 ⁺	76 ± 19	221 ± 52 †	119 ± 22	75 ± 19	
Microparticules d'origine monocyttaire (CD14+)					
AnnV ⁺ /CD14 ⁺	149 ± 40	206 ± 26	209 ± 26	194 ± 30	
FT ⁺ /CD14 ⁺	162 ± 27	496 ± 105 †	319 ± 47	230 ± 47	
AnnV ⁺ /FT ⁺ /CD14 ⁺	49 ± 9	189 ± 37 ‡ †	139 ± 20	88 ± 13 #	

Valeurs exprimées en moyenne ± SEM. AnnV signifie annexine V; FT, tissue factor; EPCR, endothelial protein C receptor;

Valeurs exprimées en moyenne ± SEM. FT signifie facteur tissulaire ; AnnV : annexine V ; EPCR : endothelial protein C receptor

Valeurs p : * Ad vs. Sor: p<0.05, ‡ Ad. vs. PostHo: p<0.05, § Sor. vs. PostHo: p<0.05, † Ad. vs. CT: p<0.05, # PostHo. vs. CT: p<0.05

Figure 18 Nombre et répartition des microparticules en fonction de leur origine cellulaire et de leur marquage



L'analyse FACS (fluorescence tri cellulaire) des microparticules d'origine endothéliale- (CD144-positive), plaquettaire- (CD41-positive) et monocytaire- (CD14-positive) avec double marquage par annexine et facteur tissulaire (TF9-10H10) à l'admission (Ad), à la sortie de l'hôpital (So), à distance de la phase hospitalière (postHo) comparé au groupe contrôle (CT).

In vitro, la génération de thrombine est accélérée et la sensibilité à la PCa diminuée chez les patients insuffisants cardiaques à l'admission

Nous avons ensuite pour objectif de déterminer les résultats des effets pro et anticoagulants des MPS dans la balance hémostatique. Nous avons ainsi exploré le processus de génération de thrombine et sa régulation par le système de la PC activée in vitro par thrombinographie. Comparé aux patients du groupe contrôle, l'ETP mesuré en PRP était significativement plus élevé, le temps de latence et le temps pour atteindre le pic plus courts, chez les patients insuffisants cardiaques à l'admission. (tableau 7)

Afin d'évaluer le degré de responsabilité des plaquettes dans ce phénotype hypercoagulable, nous avons suivi la génération de thrombine dans le plasma déplété en plaquettes. Les valeurs d'ETP obtenues en PDP étaient plus élevées de plus de 30% chez les patients insuffisants cardiaques à l'admission par rapport au groupe contrôle sans atteindre le seuil de significativité. Le temps de latence et le temps pour atteindre le pic étaient surtout significativement plus courts dans le groupe de patients insuffisants cardiaques. Ces données laissent à penser que les plaquettes ne jouent pas un rôle majeur dans ce phénotype hypercoagulable. Il aurait été intéressant ici de disposer de données exhaustives concernant la réactivité plaquettaire dans les différents groupes de patients. Sur les données partielles dont nous disposons, on ne note pas de différence notable entre les deux groupes de sujets ni dans le suivi des patients insuffisants cardiaques. Il faut tenir compte dans cette analyse l'administration non indiquée chez plusieurs patients d'un antiagrégant plaquettaire qui est ensuite arrêté.

Afin d'évaluer la contribution des MPs procoagulantes dans ce phénotype hypercoagulable, nous avons évalué la corrélation entre les paramètres de thrombinographie et les MPs FT⁺ (incluant à la fois les MPs Ann V⁺ et Ann V⁻) chez les patients insuffisants cardiaques.

A l'admission, les concentrations d'eMPs FT⁺ et de pMPs FT⁺ étaient significativement corrélées à l'ETPo ($r=0,37$, $p=0,037$ et $r=0,41$, $p=0,02$ respectivement) et au pic de génération de thrombine ($r=0,36$, $p=0,04$ et $r=0,36$, $p<0,05$ respectivement) obtenu en PRP.

Nous avons également pu suivre l'évolution des paramètres de génération de thrombine obtenus en PRP au cours du suivi chez les patients insuffisants cardiaques. Nos résultats montrent que le pic de thrombine et le temps pour atteindre le pic, étaient respectivement significativement moins élevés et plus long chez les patients insuffisants cardiaques lors de la période post hospitalière comparé à la sortie d'hospitalisation. (Figure 19A et table 7). De même, en PDP, le pic de thrombine et la vélocité étaient significativement diminués et le temps pour atteindre le pic prolongé chez les patients insuffisants cardiaques lors de la période post hospitalière comparé à l'admission à l'hôpital. (Figure 19 B and Table 7). Enfin, les paramètres thrombiniques ne montrent pas de différence entre les patients insuffisants cardiaques pendant la période post hospitalière et le groupe contrôle, excepté un temps de latence plus court en PRP ce qui démontre que ce phénotype d'hypercoagulabilité s'exprime essentiellement lors de la phase aiguë de la décompensation cardiaque.

La voie de la protéine C activée étant un système dynamique anticoagulant, nous avons essayé de déterminer si la résistance à la protéine C peut contribuer à l'état d'hypercoagulabilité des patients insuffisants cardiaques.

Comparé au groupe contrôle, les valeurs d'ETP en présence des différentes concentrations en PCa mesurée en PRP sont significativement supérieures chez les patients insuffisants cardiaques à l'admission (Figure 19-B). En revanche, cette augmentation des valeurs d'ETP est très largement réduite après la sortie du patient (Figure 19C). Lorsque la résistance à la PCa est évaluée en utilisant la valeur de la concentration (IC50-PCa) de PCa provoquant une inhibition de la moitié de l'ETP en l'absence de PCa, une diminution significative de la réponse à la PCa chez les patients insuffisants cardiaques à l'admission comparée à la période post hospitalière que ce soit en PRP et en PPP.

En ce qui concerne les patients décédés précocement durant le suivi, ils sont au nombre de 5. Quatre d'entre eux avaient plus de 80 ans et sont décédés de cause inconnue dans les trois mois qui ont suivi l'hospitalisation sans que les paramètres thrombiniques ni le nombre de microparticules ne diffèrent initialement par rapport aux autres patients de ce groupe.

Tableau 7 L'insuffisance cardiaque aiguë augmente la génération de thrombine et altère la sensibilité à la PCa

	Groupe contrôle (CT) N = 19	Groupe Admission (Ad) N = 32	Groupe sortie d'hospitalisation (Sor) N = 29	Groupe Période posthospitalière (PostHo) N = 13
Plasma riche en plaquettes				
ETP ₀ (nM.min)	915 ± 34	1262 ± 86 †	1378 ± 87	1079 ± 109
Temps de latence	20.2 ± 1.4	13.5 ± 1.1 †	13.3 ± 0.7	16.1 ± 1.2 #
Pic de génération de thrombine	79 ± 11.8	97 ± 10	115 ± 10 §	69 ± 13.7
Temps pour atteindre le pic	32.3 ± 2.8	21.4 ± 1.4 †	20.6 ± 1.1 §	27.4 ± 2.5
Vélocité (nM/min)	17 ± 5	15.7 ± 2.4	18.8 ± 2.2	9.6 ± 3.1
IC ₅₀ -PCa (nM)	7.2 ± 0.6	14.3 ± 2.4 ‡	9.4 ± 1.1	8.0 ± 1.1
Plasma déplété en plaquettes				
ETP ₀ (nM.min)	890 ± 75	1169 ± 76	1180 ± 77	861 ± 129
Temps de latence	10.9 ± 0.4	3.9 ± 0.2 †	4.7 ± 0.2	5.2 ± 0.5
Pic de génération de thrombine	189 ± 6	238 ± 18 ‡	229 ± 19	160 ± 25
Temps pour atteindre le pic	11.7 ± 0.3	6.5 ± 0.3 ‡†	7.7 ± 0.4	8.4 ± 0.7
Vélocité (nM/min)	94.6 ± 4.1	109 ± 12 ‡	99 ± 12	58 ± 9
IC ₅₀ -PCa (nM)	1.0 ± 0.05	2.0 ± 0.5 ‡	1.5 ± 0.5	0.5 ± 0.1

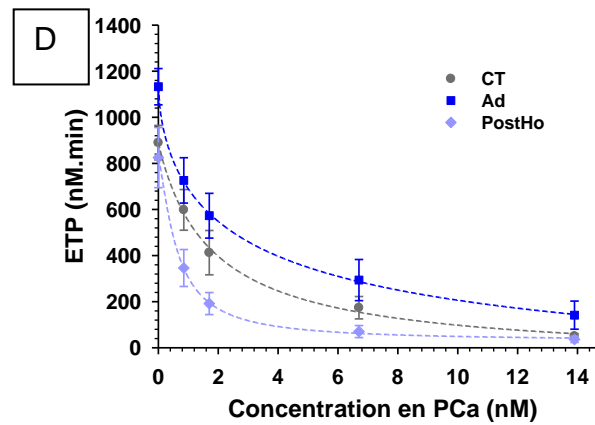
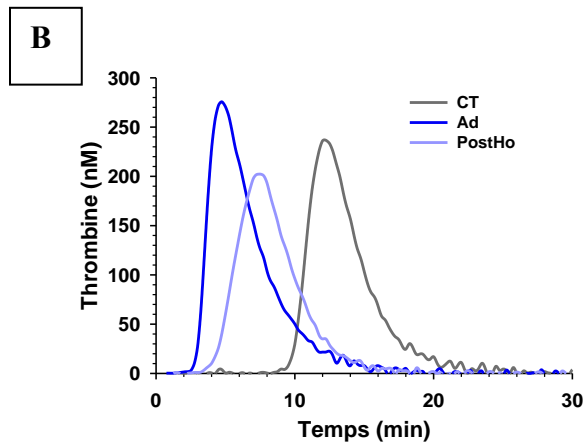
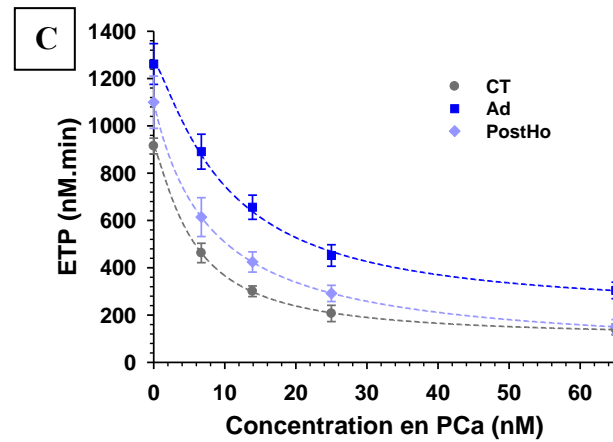
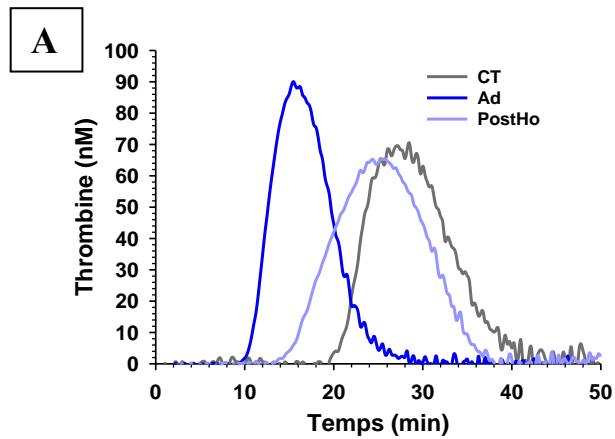
Valeurs p : * Ad vs. Sor: p<0.05, ‡ Ad. vs. PostH: p<0.05, § Sor. vs. PostH: p<0.05, † Ad. vs. CT: p<0.05, # PostH. vs. CT: p<0.05

Figure 19 L'insuffisance cardiaque aiguë augmente la génération de thrombine et altère la sensibilité à la PCa

Génération de thrombine déclenchée par 0,5 pM de facteur tissulaire et monitorée par thrombinographie.

A et C. Courbes de génération de thrombine réalisées avec du plasma riche en plaquettes ajusté à 300×10^9 plaquettes/L ou avec du plasma déplété en plaquettes + 4 μM de vésicules phosphatidylsérine/-ethanolamine/choline (PS/PE/PC)

B et D. Inhibition du potentiel thrombinique endogène (ETP) par la PCa avec du PRP ou du PPP + 4 μM de vésicules PS/PE/PC.



VII DISCUSSION

Notre étude met en évidence des modifications biologiques chez les patients à la phase aigüe d'une décompensation en faveur d'un profil prothrombotique. L'augmentation du nombre de MPs circulantes procoagulantes et l'altération de la régulation de la génération de thrombine par le système de la PCa représentent les principaux mécanismes contribuant à l'hypercoagulabilité des patients à la phase aigüe de la décompensation cardiaque. Les travaux antérieurs menés sur les marqueurs de la coagulation dans l'insuffisance cardiaque se sont essentiellement focalisés sur l'évaluation de facteurs isolés du système d'hémostase : facteurs de coagulation plasmatiques, les marqueurs de fibrinolyse ou les marqueurs d'activation plaquettaire^{77, 235}. Cependant, cette approche ne rend pas compte de la capacité de génération de la thrombine qui est la résultante d'un schéma complexe d'actions activatrices aboutissant à la conversion de prothrombine en thrombine et inhibitrices via le système de la protéine C. Grâce à l'utilisation de la thrombinographie, une méthode intégrative permettant le suivi dynamique de la génération de la thrombine et de son inhibition *in vitro*, nous avons pu mettre en évidence dans notre étude une augmentation de la capacité de génération de thrombine chez les patients insuffisants cardiaques pendant la période d'hospitalisation (de l'admission à la sortie) comparée à la période post hospitalière et au groupe contrôle.

Dans notre étude, une majorité des patients insuffisants cardiaques à l'admission sont sous antiagrégants plaquettaires (aspirine et/ou clopidogrel). Nous avons répertorié des modifications ou un arrêt de ce traitement antiagrégant chez nombre d'entre eux durant l'hospitalisation. Corroborant les travaux antérieurs ayant rapporté un effet modeste de l'aspirine ou des inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂ sur la génération de thrombine²³⁶, le pic de

thrombine dans notre étude était inférieur, de manière non significative, de 8% chez les patients insuffisants cardiaques à l'admission par rapport à la sortie de l'hospitalisation.

Ce profil prothrombotique est observé en utilisant du PRP et du PPP, confirmant l'hypothèse que l'activation plaquettaire par la thrombine générée bien que réelle n'est pas le mécanisme prépondérant dans ce phénotype procoagulant. En revanche, cela confirme le rôle important de marqueurs solubles dans cet état d'hypercoagulabilité, en particulier les facteurs de dysfonction endothéliale et les MPs circulantes.

Chez les sujets sains, le nombre limité de microparticules, essentiellement d'origine plaquettaire et endothéliale, déclenche la formation de petite quantités de thrombine in vitro dans du PFP défibriné²³⁷. La formation de microparticules au potentiel procoagulant, en particulier les MPs annV^+ et les MPs FT^+ , permet à la fois une augmentation locale des surfaces procoagulantes mais également une dissémination de celles-ci s'accompagnant d'une génération de thrombine. En raison de la charge négative, la phosphatidylsérine, un phospholipide membranaire présent à la surface des microparticules, augmente en effet ce potentiel procoagulant en facilitant l'assemblage des facteurs de coagulation calcium dépendant à la surface des MPs et ainsi permet la formation des complexes tenase et prothrombinase.¹⁹⁴

Les MPs ont déjà été présenté comme un marqueur sensible du processus athérombotique, que ce soit dans la cardiopathie ischémique stable²³⁸ ou dans le syndrome coronaire aigu²³⁹ mais également comme un indicateur pertinent de l'évolution de l'insuffisance cardiaque²²⁷ ou de pathologies malignes²⁴⁰.

Dans le cadre de l'insuffisance cardiaque aiguë, Montoro-Garcia et coll ont établi une corrélation entre les MP de petite taille ($0,1 \mu\text{m}$) annV^+ et la sévérité de la dyspnée caractérisée par le stade NYHA de la dyspnée de même qu'une corrélation entre le nombre de microparticules marqueurs monocytaires de « réparation » et d'inflammation.²²⁹

Dans notre étude, le potentiel procoagulant des MP se traduit dans le groupe des patients insuffisants cardiaques à l'admission par un nombre élevé de MPs FT⁺ toutes origines confondues à l'admission et plus spécifiquement par celui des MPs annV⁺ FT⁺ qui ont le niveau d'activité procoagulante le plus élevé ¹⁹⁹ avec ensuite une diminution significative (de **75%**) lors de la phase post hospitalière.

Nos données démontrent pour la première fois une corrélation significative entre les eMPs annV⁺ ou les pMPs annV⁺ et la capacité globale de génération de thrombine, ce qui montre le rôle prépondérant des microparticules dans le profil biologique prothrombotique des patients à la phase aigüe d'une décompensation cardiaque. La thrombine exerce des effets pléiotropes sur les cellules endothéliales ²⁴¹, incluant la libération de microparticules endothéliales et engendrant leur dissémination. Le fait que la thrombine induise une production d'eMPs est important car ces eMPs peuvent transférer l'information de manière paracrine. Elles peuvent également initier de manière autocrine une amplification de la boucle de la génération de thrombine qui augmente localement la génération de thrombine. ²⁴²

Nos données montrent également une résistance à la PCa pendant la phase aigüe de la décompensation cardiaque. Ce phénotype d'hypercoagulabilité en rapport avec une altération de la voie de la protéine C activée a déjà été démontré dans des conditions spécifiques : le syndrome des antiphospholipides, le sepsis sévère ou l'hypertension artérielle pulmonaire primitive ^{233, 243, 244} mais pas jusqu'à présent dans l'insuffisance cardiaque congestive.

Dans l'insuffisance cardiaque aigüe, la libération d'eMPs secondaire à une dysfonction endothéliale majeure semble contribuer à la génération de thrombine excessive en début d'hospitalisation, en contribuant à l'altération du système anticoagulant endothélium dépendant que représente la voie de la protéine C activée.

En effet, le potentiel thrombinique (ETP), plus élevé en présence de PCa chez les patients en insuffisance cardiaque aigue, suggère que l'activité de la PCa pourrait être altérée par une libération importante et rapide de microparticules procoagulantes. Ceci favorise l'assemblage de complexes procoagulants sachant que l'affinité de la PCa pour les surfaces phospholipidiques est de 100 à 1000 fois inférieure à celle des autres protéines vitamine K dépendantes. Ces microparticules peuvent également fixer la PCa, et la rendre ainsi incapable d'inactiver le facteur Va. Ainsi, la libération de quantités importantes de microparticules eMPs annV^+ et TF^+ consécutive à une dysfonction endothéliale majeure représente le mécanisme principal conduisant à une résistance à la PCa.

Si les MPs procoagulantes peuvent être un des mécanismes conduisant à une résistance à la PCa lors d'une décompensation cardiaque aigüe, l'analyse des paramètres de génération de thrombine effectuée avec du PDP montre également un certain degré de résistance à la PCa. Une explication est que la technique utilisée pour obtenir du PDP n'élimine pas complètement la présence de microparticules. Des données de notre laboratoire non publiées indiquent néanmoins qu'une génération explosive de thrombine ne peut survenir en l'absence de l'ajout de membranes phospholipidiques exogènes. Nos résultats suggèrent donc que d'autres facteurs procoagulants solubles et en particulier des facteurs liés à la dysfonction endothéliale peuvent contribuer à l'altération de la voie de la protéine C.

Nous notons, en effet, que les patients insuffisants cardiaques présentent une augmentation significative du vWF et du TFPI pendant l'hospitalisation par rapport au groupe contrôle.

Un taux élevé du vWF a déjà été constaté dans l'insuffisance cardiaque aigue, il est corrélé à la classe fonctionnelle NYHA et aux événements cliniques majeurs notés dans le cadre du suivi ⁶⁶. Grabowski et coll. ²⁴⁵ ont également montré que des cellules endothéliales en culture soumises à un stress libèrent une quantité plus importante de TFPI, ce qui peut expliquer l'augmentation de TFPI dans l'insuffisance cardiaque aigüe.

Cette activation du système Protéine S/TFPI en réponse à l'état d'hypercoagulabilité et d'inflammation qui accompagnent la défaillance cardiaque rend compte d'un rétrocontrôle physiologique où l'augmentation de facteurs inhibiteurs de la coagulation vient s'opposer in vivo à l'activité des facteurs procoagulants. Ces données concordantes suggèrent en effet que le TFPI libre pourrait compenser le phénotype procoagulant induit par le facteur VIII et le vWF et ainsi agir en synergie avec la voie dynamique de la protéine C activée²⁴⁶. Cependant, les résultats de notre étude ne mettent pas en évidence de corrélation significative entre le TFPI et les différents paramètres obtenus par thrombinographie. Si des taux élevés de TFPI peuvent contrebalancer l'augmentation et l'accélération de la génération de thrombine chez les patients insuffisants cardiaques, la concentration en TFPI libre plasmatique représente surtout un biomarqueur soluble de l'activation endothéliale.

Dans notre étude, les concentrations plasmatiques de deux biomarqueurs endothéliaux solubles liés à la voie de la protéine C activée : le sTM et le sEPCR sont significativement plus élevés chez les patients insuffisants cardiaques pendant l'hospitalisation par rapport à la période post hospitalière et au groupe contrôle. Ces résultats soulignent à nouveau le rôle de l'altération de la membrane endothéliale dans cette situation pathologique.

Mis à part son action dans la voie de la protéine C, il a été montré que la sTM inhibe la fibrinolyse in vitro et ainsi contribue à l'état prothrombotique de l'insuffisance cardiaque congestive²⁴⁷. Parallèlement à l'activation de la protéine C par le complexe thrombine-TM, l'EPCR membranaire contribue également aux effets cellulaires de la PCa. La PCa associée à l'EPCR transmet des signaux cytoprotecteurs par l'intermédiaire du PAR-1^{100, 248}. L'EPCR membranaire diffère de la forme circulante (sEPCR), clivée par une métalloprotéinase à la surface de la cellule et qui est augmentée de manière significative dans notre étude à la phase aigüe de la décompensation cardiaque. La forme soluble de l'EPCR inhibe au contraire l'activation de la protéine C en se liant à celle-ci de manière compétitive par rapport la forme

membranaire située sur la paroi vasculaire. Elle inhibe l'activité anticoagulante de la PCa en interagissant avec les résidus-Gla nécessaire à une liaison efficace de la PCa avec les membranes phospholipidiques avec comme conséquence l'absence d'inactivation des facteurs Va et VIIIa²⁴⁹. Nous montrons également dans notre étude que la concentration de sEPCR augmente de 50% durant l'hospitalisation par rapport à la phase post hospitalière alors que ces concentrations ne diffèrent pas par rapport à celle du groupe contrôle. Ceci contribue probablement à la résistance de la protéine C activée pendant la décompensation cardiaque aiguë. Nous constatons également à une augmentation des eMP EPCR+ annexine+ durant l'hospitalisation mais cette source d'EPCR membranaire ne semble pas suffisante à compenser l'altération de la voie de la protéine C par l'EPCR soluble.

Enfin, ce phénotype hypercoagulable présent chez les patients insuffisants cardiaques durant l'hospitalisation ne persiste pas après la sortie d'hospitalisation. Ces résultats contrastent avec ceux publiés précédemment dans la littérature qui font état d'un degré d'hypercoagulabilité chez les patients insuffisants cardiaques chroniques attesté par exemple par une augmentation de concentration des complexes TAT (thrombine antithrombine), des fragments 1+2 prothrombine et des paramètres de fibrinolyse^{52, 53, 65, 68}. Ceci peut s'expliquer, dans une certaine mesure, par une dysfonction ventriculaire gauche relativement modérée chez les patients insuffisants cardiaques dans notre étude (16 patients sur 34 ont une FEVG \geq 40%). Cependant, cela traduit surtout la difficulté à établir un état d'hypercoagulabilité chez les patients insuffisants cardiaques stables et explique peut être en partie les résultats décevants des traitements anticoagulants dans l'insuffisance cardiaque chronique.

Ainsi, la mise en route d'un traitement anticoagulant à la phase aiguë d'une décompensation cardiaque ou de manière précoce par rapport à cette hospitalisation comme dans l'étude randomisée COMMANDER-HF avec le rivoroxaban, pourrait avoir des effets favorables sur le devenir de ces patients.

VIII LIMITES DE L'ETUDE

Il s'agit d'une étude descriptive incluant un nombre limité de patients hospitalisés pour une insuffisance cardiaque aiguë admis en hospitalisation. Elle n'est pas complètement représentative de l'ensemble de la population atteinte d'insuffisance cardiaque, comme la plupart des études cliniques sur le sujet, mais il s'agit d'une population avec un taux élevé d'évènements cliniques à court et moyen terme et qui nécessite de nouvelles thérapeutiques.

Le caractère longitudinal de notre étude permet de mettre en évidence une génération exagérée de thrombine à la phase aiguë d'une décompensation cardiaque grâce à une méthode intégrative de l'étude de la coagulation. Ceci nécessite une validation par d'autres études prospectives permettant d'établir définitivement la significativité physiopathologique de l'interaction entre les MP circulantes, les facteurs procoagulants, l'activité de la PCa, l'activation plaquettaire et leurs valeurs pronostiques dans l'insuffisance cardiaque aiguë.

D'autre part, notre étude souligne l'importance d'introduire la thrombinographie comme une méthode de référence pour l'évaluation de l'hypercoagulabilité dans les futurs travaux de recherche menés sur l'hypercoagulabilité dans l'insuffisance cardiaque.

Enfin, l'identification des différents mécanismes conduisant à une génération excessive de thrombine pourrait aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques en amont de celle-ci sans augmentation du risque de saignement.

IX CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les patients en insuffisance cardiaque aigue présentent un phénotype biologique hypercoagulable qui se caractérise par une génération de thrombine accélérée, une diminution de la capacité de régulation du système anticoagulant de la protéine C activée et des modifications des MPs procoagulantes. Ce profil prothrombotique est spécifique de la phase aigüe de la décompensation cardiaque et il diminue avec l'amélioration clinique du patient. Nos conclusions confirment le rôle de la génération de thrombine dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque aigue et suggèrent que la génération de thrombine et le marquage des MPs sont sensibles à l'évolution clinique de cette maladie. D'autres travaux de recherche pourraient aider à établir les méthodes d'évaluation de la génération de thrombine et la signature procoagulante des MPs comme des biomarqueurs fiables de l'hypercoagulabilité dans l'insuffisance cardiaque aigue afin d'identifier de manière fiable les sujets devant bénéficier d'un traitement antithrombotique.

Ces résultats corroborent non seulement l'hypothèse de l'implication d'un mécanisme thrombotique dans le mauvais pronostic de la maladie mais également l'intérêt potentiel d'administrer chez ces patients un inhibiteur direct anti Xa et anti IIa. Cette hypothèse a déjà conduit à la mise en place d'un essai explorant des doses anti-thrombiniques et infra anti-coagulantes du rivaroxaban, un facteur antiXa dans l'insuffisance cardiaque ischémique avec une décompensation aigue (COMMANDER-HF, clinical trials.gov NCT01877915, F Zannad, Investigateur principal). Suite à nos résultats obtenus chez des patients lors d'une

décompensation cardiaque aiguë d'origine non ischémique, une des perspectives serait d'étudier le phénotype de génération de thrombine dans le syndrome coronaire aigu et notamment se compliquant par une décompensation cardiaque aiguë et de déterminer si les mêmes mécanismes physiopathologiques sont activés. Enfin, les nouvelles molécules anticoagulantes (NACO) ont l'avantage de cibler la thrombine mais présentent l'inconvénient de ne pas avoir de tests précis de surveillance majorant ainsi le risque hémorragique. La mesure de la génération de thrombine permettra d'optimiser le bénéfice antithrombotique / risque hémorragiques de ces nouvelles molécules extrêmement coûteuses et d'utilisation croissante.

X. REFERENCES

1. Mosterd A and Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007;93:1137-46.
2. Kociol RD, Hammill BG, Fonarow GC, Klaskala W, Mills RM, Hernandez AF and Curtis LH. Generalizability and longitudinal outcomes of a national heart failure clinical registry: Comparison of Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) and non-ADHERE Medicare beneficiaries. *American heart journal*. 2010;160:885-92.
3. Chen J, Normand SL, Wang Y and Krumholz HM. National and regional trends in heart failure hospitalization and mortality rates for Medicare beneficiaries, 1998-2008. *Jama*. 2011;306:1669-78.
4. Gurbel PA and Tantry US. Antiplatelet and anticoagulant agents in heart failure: current status and future perspectives. *JACC Heart Fail*. 2014;2:1-14.
5. O'Connor CM, Gottlieb S, Bourque JM, Krause-Steinrauf H, Anand I, Anderson JL, Plehn JF, Silver MA, White M, Carson P and Investigators B. Impact of nonfatal myocardial infarction on outcomes in patients with advanced heart failure and the effect of bucindolol therapy. *Am J Cardiol*. 2005;95:558-64.
6. Gissi HFI, Tavazzi L, Maggioni AP, Marchioli R, Barlera S, Franzosi MG, Latini R, Lucci D, Nicolosi GL, Porcu M and Tognoni G. Effect of rosuvastatin in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008;372:1231-9.
7. McMurray JJ, Ostergren J, Swedberg K, Granger CB, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Yusuf S, Pfeffer MA, Investigators C and Committees. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet*. 2003;362:767-71.
8. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM and Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial I. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med*. 2003;349:1893-906.
9. Stevenson WG, Stevenson LW, Middlekauff HR and Saxon LA. Sudden death prevention in patients with advanced ventricular dysfunction. *Circulation*. 1993;88:2953-61.
10. Uretsky BF, Thygesen K, Armstrong PW, Cleland JG, Horowitz JD, Massie BM, Packer M, Poole-Wilson PA and Ryden L. Acute coronary findings at autopsy in heart failure patients with sudden death: results from the assessment of treatment with lisinopril and survival (ATLAS) trial. *Circulation*. 2000;102:611-6.
11. Parissis JT, Papadakis J, Kadoglou NP, Varounis C, Psarogiannakopoulos P, Rafouli-Stergiou P, Ikonomidis I, Paraskevaidis I, Dimopoulou I, Zerva A, Dima K, Anastasiou-Nana M and Filippatos G. Prognostic value of high sensitivity troponin T in patients with acutely decompensated heart failure and non-detectable conventional troponin T levels. *Int J Cardiol*. 2013;168:3609-12.
12. Peacock WFT, De Marco T, Fonarow GC, Diercks D, Wynne J, Apple FS, Wu AH and Investigators A. Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. *The New England journal of medicine*. 2008;358:2117-26.
13. O'Connor CM, Fuzat M, Lombardi C, Fujita K, Jia G, Davison BA, Cleland J, Bloomfield D, Dittrich HC, Delucca P, Givertz MM, Mansoor G, Ponikowski P, Teerlink JR, Voors AA, Massie BM, Cotter G and Metra M. Impact of serial troponin release on outcomes in patients with acute heart failure: analysis from the PROTECT pilot study. *Circulation Heart failure*. 2011;4:724-32.
14. Alikhan R and Spyropoulos AC. Epidemiology of venous thromboembolism in cardiorespiratory and infectious disease. *The American journal of medicine*. 2008;121:935-42.
15. Alikhan R, Peters F, Wilmott R and Cohen AT. Fatal pulmonary embolism in hospitalised patients: a necropsy review. *Journal of clinical pathology*. 2004;57:1254-7.
16. Mebazaa A, Spiro TE, Buller HR, Haskell L, Hu D, Hull R, Merli G, Schellong SW, Spyropoulos AC, Tapson VF, De Sanctis Y and Cohen AT. Predicting the risk of venous thromboembolism in patients hospitalized with heart failure. *Circulation*. 2014;130:410-8.

17. Wang Y, Liu ZH, Zhang HL, Luo Q, Zhao ZH and Zhao Q. Association of elevated NTproBNP with recurrent thromboembolic events after acute pulmonary embolism. *Thrombosis research*. 2012;129:688-92.
18. Geerts WH, Bergqvist D, Pineo GF, Heit JA, Samama CM, Lassen MR, Colwell CW and American College of Chest P. Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008;133:381S-453S.
19. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A and Guidelines ESCCfP. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2012;33:1787-847.
20. Haeusler KG, Laufs U and Endres M. Chronic heart failure and ischemic stroke. *Stroke*. 2011;42:2977-82.
21. Witt BJ, Gami AS, Ballman KV, Brown RD, Jr., Meverden RA, Jacobsen SJ and Roger VL. The incidence of ischemic stroke in chronic heart failure: a meta-analysis. *Journal of cardiac failure*. 2007;13:489-96.
22. Furie KL, Goldstein LB, Albers GW, Khatri P, Neyens R, Turakhia MP, Turan TN, Wood KA, American Heart Association Stroke C, Council on Quality of C, Outcomes R, Council on Cardiovascular N, Council on Clinical C and Council on Peripheral Vascular D. Oral antithrombotic agents for the prevention of stroke in nonvalvular atrial fibrillation: a science advisory for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2012;43:3442-53.
23. Pullicino PM, Halperin JL and Thompson JL. Stroke in patients with heart failure and reduced left ventricular ejection fraction. *Neurology*. 2000;54:288-94.
24. Divani AA, Vazquez G, Asadollahi M, Qureshi AI and Pullicino P. Nationwide frequency and association of heart failure on stroke outcomes in the United States. *J Card Fail*. 2009;15:11-6.
25. Vemmos K, Ntaios G, Savvari P, Vemmou AM, Koroboki E, Manios E, Kounali A and Lip GY. Stroke aetiology and predictors of outcome in patients with heart failure and acute stroke: a 10-year follow-up study. *Eur J Heart Fail*. 2012;14:211-8.
26. Appelros P, Nydevik I and Viitanen M. Poor outcome after first-ever stroke: predictors for death, dependency, and recurrent stroke within the first year. *Stroke*. 2003;34:122-6.
27. Siachos T, Vanbakel A, Feldman DS, Uber W, Simpson KN and Pereira NL. Silent strokes in patients with heart failure. *J Card Fail*. 2005;11:485-9.
28. Loh E, Sutton MS, Wun CC, Rouleau JL, Flaker GC, Gottlieb SS, Lamas GA, Moye LA, Goldhaber SZ and Pfeffer MA. Ventricular dysfunction and the risk of stroke after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 1997;336:251-7.
29. Olsson LG, Swedberg K, Ducharme A, Granger CB, Michelson EL, McMurray JJ, Puu M, Yusuf S, Pfeffer MA and Investigators C. Atrial fibrillation and risk of clinical events in chronic heart failure with and without left ventricular systolic dysfunction: results from the Candesartan in Heart failure-Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) program. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47:1997-2004.
30. Cleland JG, Shelton R, Nikitin N, Ford S, Frison L and Grind M. Prevalence of markers of heart failure in patients with atrial fibrillation and the effects of ximelagatran compared to warfarin on the incidence of morbid and fatal events: a report from the SPORTIF III and V trials. *European journal of heart failure*. 2007;9:730-9.
31. Cokkinos DV, Haralabopoulos GC, Kostis JB, Toutouzas PK and investigators H. Efficacy of antithrombotic therapy in chronic heart failure: the HELAS study. *European journal of heart failure*. 2006;8:428-32.
32. Cleland JG, Findlay I, Jafri S, Sutton G, Falk R, Bulpitt C, Prentice C, Ford I, Trainer A and Poole-Wilson PA. The Warfarin/Aspirin Study in Heart failure (WASH): a randomized trial comparing antithrombotic strategies for patients with heart failure. *American heart journal*. 2004;148:157-64.

33. Massie BM, Collins JF, Ammon SE, Armstrong PW, Cleland JG, Ezekowitz M, Jafri SM, Krol WF, O'Connor CM, Schulman KA, Teo K, Warren SR and Investigators WT. 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*. 2009;119:1616-24.
34. Homma S, Thompson JL, Pullicino PM, Levin B, Freudenberger RS, Teerlink JR, Ammon SE, Graham S, Sacco RL, Mann DL, Mohr JP, Massie BM, Labovitz AJ, Anker SD, Lok DJ, Ponikowski P, Estol CJ, Lip GY, Di Tullio MR, Sanford AR, Mejia V, Gabriel AP, del Valle ML, Buchsbaum R and Investigators W. Warfarin and aspirin in patients with heart failure and sinus rhythm. *The New England journal of medicine*. 2012;366:1859-69.
35. Homma S, Thompson JL, Qian M, Ye S, Di Tullio MR, Lip GY, Mann DL, Sacco RL, Levin B, Pullicino PM, Freudenberger RS, Teerlink JR, Graham S, Mohr JP, Labovitz AJ, Buchsbaum R, Estol CJ, Lok DJ, Ponikowski P, Anker SD and Investigators W. Quality of anticoagulation control in preventing adverse events in patients with heart failure in sinus rhythm: warfarin versus aspirin in reduced cardiac ejection fraction trial substudy. *Circ Heart Fail*. 2015;8:504-9.
36. Alikhan R, Cohen AT, Combe S, Samama MM, Desjardins L, Eldor A, Janbon C, Leizorovicz A, Olsson CG and Turpie AG. Prevention of venous thromboembolism in medical patients with enoxaparin: a subgroup analysis of the MEDENOX study. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2003;14:341-6.
37. Task Force on the management of ST-segment elevation, Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blomstrom-Lundqvist C, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, Mahaffey KW, Valgimigli M, van 't Hof A, Widimsky P and Zahger D. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2012;33:2569-619.
38. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg PG, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M and Guidelines ESCCfP. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2008;29:2909-45.
39. Bonde L, Sorensen R, Fosbol EL, Abildstrom SZ, Hansen PR, Kober L, Schramm TK, Bretler DM, Weeke P, Olesen J, Torp-Pedersen C and Gislason GH. 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*. 2010;55:1300-7.
40. Lincoff AM, Bittl JA, Harrington RA, Feit F, Kleiman NS, Jackman JD, Sarembock IJ, Cohen DJ, Spriggs D, Ebrahimi R, Keren G, Carr J, Cohen EA, Betriu A, Desmet W, Kereiakes DJ, Rutsch W, Wilcox RG, de Feyter PJ, Vahanian A, Topol EJ and Investigators R-. Bivalirudin and provisional glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with heparin and planned glycoprotein IIb/IIIa blockade during percutaneous coronary intervention: REPLACE-2 randomized trial. *Jama*. 2003;289:853-63.
41. Stone GW, McLaurin BT, Cox DA, Bertrand ME, Lincoff AM, Moses JW, White HD, Pocock SJ, Ware JH, Feit F, Colombo A, Aylward PE, Cequier AR, Darius H, Desmet W, Ebrahimi R, Hamon M, Rasmussen LH, Rupprecht HJ, Hoekstra J, Mehran R, Ohman EM and Investigators A. Bivalirudin for patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine*. 2006;355:2203-16.
42. Stone GW, Witzenbichler B, Guagliumi G, Peruga JZ, Brodie BR, Dudek D, Kornowski R, Hartmann F, Gersh BJ, Pocock SJ, Dangas G, Wong SC, Kirtane AJ, Parise H, Mehran R and Investigators H-AT. Bivalirudin during primary PCI in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2008;358:2218-30.
43. Dangas. Impact of Bivalirudin therapy on mortality in patients with high features undergoing PCI: a patient-level pooled analysis from the REPLACE-2, ACUITY, and HORIZON-AMI trials (abstr). *European heart journal*. 2011;32:232-3.
44. Kohli P CA, Bansilal S et al. on behalf of TIMI Study Group. Reduction in mortality from thrombin inhibition in CHF patients: results from the premier hospital database. *European heart journal*. 2013;33:Suppl 1: 393.

45. Miller CS, Grandi SM, Shimony A, Filion KB and Eisenberg MJ. Meta-analysis of efficacy and safety of new oral anticoagulants (dabigatran, rivaroxaban, apixaban) versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The American journal of cardiology*. 2012;110:453-60.
46. Banerjee A, Lane DA, Torp-Pedersen C and Lip GY. Net clinical benefit of new oral anticoagulants (dabigatran, rivaroxaban, apixaban) versus no treatment in a 'real world' atrial fibrillation population: a modelling analysis based on a nationwide cohort study. *Thrombosis and haemostasis*. 2012;107:584-9.
47. Ahmad Y, Lip GY and Apostolakis S. New oral anticoagulants for stroke prevention in atrial fibrillation: impact of gender, heart failure, diabetes mellitus and paroxysmal atrial fibrillation. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2012;10:1471-80.
48. Oldgren J, Budaj A, Granger CB, Khder Y, Roberts J, Siegbahn A, Tijssen JG, Van de Werf F, Wallentin L and Investigators R-D. Dabigatran vs. placebo in patients with acute coronary syndromes on dual antiplatelet therapy: a randomized, double-blind, phase II trial. *Eur Heart J*. 2011;32:2781-9.
49. Alexander JH, Lopes RD, James S, Kilaru R, He Y, Mohan P, Bhatt DL, Goodman S, Verheugt FW, Flather M, Huber K, Liaw D, Husted SE, Lopez-Sendon J, De Caterina R, Jansky P, Darius H, Vinereanu D, Cornel JH, Cools F, Atar D, Leiva-Pons JL, Keltai M, Ogawa H, Pais P, Parkhomenko A, Ruzyllo W, Diaz R, White H, Ruda M, Geraldles M, Lawrence J, Harrington RA, Wallentin L and Investigators A-. Apixaban with antiplatelet therapy after acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2011;365:699-708.
50. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, Burton P, Cohen M, Cook-Bruns N, Fox KA, Goto S, Murphy SA, Plotnikov AN, Schneider D, Sun X, Verheugt FW, Gibson CM and Investigators AAT. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012;366:9-19.
51. Zannad F, Stough WG, Regnault V, Gheorghide M, Deliargyris E, Gibson CM, Agewall S, Berkowitz SD, Burton P, Calvo G, Goldstein S, Verheugt FW, Koglin J and O'Connor CM. Is thrombosis a contributor to heart failure pathophysiology? Possible mechanisms, therapeutic opportunities, and clinical investigation challenges. *Int J Cardiol*. 2013;167:1772-82.
52. Yamamoto K, Ikeda U, Furuhashi K, Irokawa M, Nakayama T and Shimada K. The coagulation system is activated in idiopathic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995;25:1634-40.
53. Jafri SM, Ozawa T, Mammen E, Levine TB, Johnson C and Goldstein S. Platelet function, thrombin and fibrinolytic activity in patients with heart failure. *Eur Heart J*. 1993;14:205-12.
54. Jafri SM, Mammen EF, Masura J and Goldstein S. Effects of warfarin on markers of hypercoagulability in patients with heart failure. *American heart journal*. 1997;134:27-36.
55. Asakura H, Hifumi S, Jokaji H, Saito M, Kumabashiri I, Uotani C, Morishita E, Yamazaki M, Shibata K, Mizuhashi K and et al. Prothrombin fragment F1 + 2 and thrombin-antithrombin III complex are useful markers of the hypercoagulable state in atrial fibrillation. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 1992;3:469-73.
56. Bettari L, Fiuzat M, Becker R, Felker GM, Metra M and O'Connor CM. Thromboembolism and antithrombotic therapy in patients with heart failure in sinus rhythm: current status and future directions. *Circulation Heart failure*. 2011;4:361-8.
57. Mehta J and Mehta P. Platelet function studies in heart disease. VI. Enhanced platelet aggregate formation activity in congestive heart failure: inhibition by sodium nitroprusside. *Circulation*. 1979;60:497-503.
58. Sbarouni E, Bradshaw A, Andreotti F, Tuddenham E, Oakley CM and Cleland JG. Relationship between hemostatic abnormalities and neuroendocrine activity in heart failure. *American heart journal*. 1994;127:607-12.
59. Serebruany VL, Murugesan SR, Pothula A, Atar D, Lowry DR, O'Connor CM and Gurbel PA. Increased soluble platelet/endothelial cellular adhesion molecule-1 and osteonectin levels in patients with severe congestive heart failure. Independence of disease etiology, and antecedent aspirin therapy. *European journal of heart failure*. 1999;1:243-9.

60. Serebruany V, McKenzie M, Meister A, Fuzaylov S, Gurbel P, Atar D, Gattis W and O'Connor C. Whole blood impedance aggregometry for the assessment of platelet function in patients with congestive heart failure (EPCOT Trial). *European journal of heart failure*. 2002;4:461-7.
61. Kitta Y, Obata JE, Nakamura T, Hirano M, Kodama Y, Fujioka D, Saito Y, Kawabata K, Sano K, Kobayashi T, Yano T, Nakamura K and Kugiyama K. Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53:323-30.
62. Fischer D, Rossa S, Landmesser U, Spiekermann S, Engberding N, Hornig B and Drexler H. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *European heart journal*. 2005;26:65-9.
63. Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, Balidemaj K, Dimayuga C, Hudaihed A and Yasskiy A. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2005;111:310-4.
64. Kitzman DW, Brubaker PH, Herrington DM, Morgan TM, Stewart KP, Hundley WG, Abdelhamed A and Haykowsky MJ. Effect of endurance exercise training on endothelial function and arterial stiffness in older patients with heart failure and preserved ejection fraction: a randomized, controlled, single-blind trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62:584-92.
65. Cugno M, Mari D, Meroni PL, Gronda E, Vicari F, Frigerio M, Coppola R, Bottasso B, Borghi MO and Gregorini L. Haemostatic and inflammatory biomarkers in advanced chronic heart failure: role of oral anticoagulants and successful heart transplantation. *Br J Haematol*. 2004;126:85-92.
66. Chong AY, Freestone B, Patel J, Lim HS, Hughes E, Blann AD and Lip GY. Endothelial activation, dysfunction, and damage in congestive heart failure and the relation to brain natriuretic peptide and outcomes. *Am J Cardiol*. 2006;97:671-5.
67. Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM and Tantry U. Platelet activation in myocardial ischemic syndromes. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2004;2:535-45.
68. Chin BS, Blann AD, Gibbs CR, Chung NA, Conway DG and Lip GY. Prognostic value of interleukin-6, plasma viscosity, fibrinogen, von Willebrand factor, tissue factor and vascular endothelial growth factor levels in congestive heart failure. *Eur J Clin Invest*. 2003;33:941-8.
69. Gibbs CR, Blann AD, Watson RD and Lip GY. Abnormalities of hemorheological, endothelial, and platelet function in patients with chronic heart failure in sinus rhythm: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and beta-blocker therapy. *Circulation*. 2001;103:1746-51.
70. De Mey JG, Claeys M and Vanhoutte PM. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1982;222:166-73.
71. Luscher TF, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, von Segesser L, Yang ZH, Turina M, Gradel E, Weber E and et al. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *The New England journal of medicine*. 1988;319:462-7.
72. Yang Z, Arnet U, Bauer E, von Segesser L, Siebenmann R, Turina M and Luscher TF. Thrombin-induced endothelium-dependent inhibition and direct activation of platelet-vessel wall interaction. Role of prostacyclin, nitric oxide, and thromboxane A2. *Circulation*. 1994;89:2266-72.
73. Eto M, Barandier C, Rathgeb L, Kozai T, Joch H, Yang Z and Luscher TF. Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. *Circulation research*. 2001;89:583-90.
74. Gershlick AH. Are there markers of the blood-vessel wall interaction and of thrombus formation that can be used clinically? *Circulation*. 1990;81:I28-34; discussion I40-1.
75. Breton-Gorius J, Clezardin P, Guichard J, Debili N, Malaval L, Vainchenker W, Cramer EM and Delmas PD. Localization of platelet osteonectin at the internal face of the alpha-granule membranes in platelets and megakaryocytes. *Blood*. 1992;79:936-41.

76. Malinin AI, O'Connor CM, Dzhnanashvili AI, Sane DC and Serebruany VL. Platelet activation in patients with congestive heart failure: do we have enough evidence to consider clopidogrel? *American heart journal*. 2003;145:397-403.
77. O'Connor CM, Gurbel PA and Serebruany VL. Usefulness of soluble and surface-bound P-selectin in detecting heightened platelet activity in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1999;83:1345-9.
78. Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris T, Benjamin EJ, Sawyer DB, Levy D, Wilson PW, D'Agostino RB and Framingham Heart S. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2003;107:1486-91.
79. Chin BS, Conway DS, Chung NA, Blann AD, Gibbs CR and Lip GY. Interleukin-6, tissue factor and von Willebrand factor in acute decompensated heart failure: relationship to treatment and prognosis. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2003;14:515-21.
80. Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H and Mann DL. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *Journal of cardiac failure*. 1996;2:243-9.
81. Anand IS, Latini R, Florea VG, Kuskowski MA, Rector T, Masson S, Signorini S, Mocarelli P, Hester A, Glazer R, Cohn JN and Val-He FTI. C-reactive protein in heart failure: prognostic value and the effect of valsartan. *Circulation*. 2005;112:1428-34.
82. Raymond RJ, Dehmer GJ, Theoharides TC and Deliangryis EN. Elevated interleukin-6 levels in patients with asymptomatic left ventricular systolic dysfunction. *American heart journal*. 2001;141:435-8.
83. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM and Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *The New England journal of medicine*. 1990;323:236-41.
84. Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW and LeJemtel TH. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 1996;28:964-71.
85. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB and Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Journal of the American College of Cardiology*. 1996;27:1201-6.
86. Opal SM. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Critical care medicine*. 2000;28:S77-80.
87. Taylor FB, Jr., Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw L, Catlett R, Blick K and Edgington TS. Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock*. 1991;33:127-34.
88. van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJ, Hack CE, Sauerwein HP, Rosenberg RD and ten Cate JW. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *The New England journal of medicine*. 1990;322:1622-7.
89. van der Poll T, Levi M, van Deventer SJ, ten Cate H, Haagmans BL, Biemond BJ, Buller HR, Hack CE and ten Cate JW. Differential effects of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees. *Blood*. 1994;83:446-51.
90. van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, de Groot ER, Jansen J, Gallati H, Buller HR and et al. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179:1253-9.
91. Petaja J. Inflammation and coagulation. An overview. *Thrombosis research*. 2011;127 Suppl 2:S34-7.

92. Osterud B and Bjorklid E. Sources of tissue factor. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2006;32:11-23.
93. van der Poll T, de Jonge E and Levi M. Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2001;27:639-51.
94. Sower LE, Froelich CJ, Carney DH, Fenton JW, 2nd and Klimpel GR. Thrombin induces IL-6 production in fibroblasts and epithelial cells. Evidence for the involvement of the seven-transmembrane domain (STD) receptor for alpha-thrombin. *Journal of immunology*. 1995;155:895-901.
95. Levi M and van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Critical care medicine*. 2010;38:S26-34.
96. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407:258-64.
97. Szaba FM and Smiley ST. Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood*. 2002;99:1053-9.
98. Johnson K, Choi Y, DeGroot E, Samuels I, Creasey A and Aarden L. Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *Journal of immunology*. 1998;160:5130-5.
99. Rahman A, Anwar KN, True AL and Malik AB. Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF-kappa B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion. *Journal of immunology*. 1999;162:5466-76.
100. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM and Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science*. 2002;296:1880-2.
101. Finigan JH, Dudek SM, Singleton PA, Chiang ET, Jacobson JR, Camp SM, Ye SQ and Garcia JG. Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:17286-93.
102. Pinet C, Algalarrondo V, Sablayrolles S, Le Grand B, Pignier C, Cussac D, Perez M, Hatem SN and Coulombe A. Protease-activated receptor-1 mediates thrombin-induced persistent sodium current in human cardiomyocytes. *Molecular pharmacology*. 2008;73:1622-31.
103. Alesci S, Bartholomae P, Kaden JJ, Thieleke H, Suselbeck T, Wolpert C, Robitzki A, Reiniger-Mack A, Borggreffe M and Dempfle CE. First report on the effect of thrombin and factor Xa on cardiomyocytes in a three-dimensional cell culture model. *Thrombosis research*. 2009;124:375-6.
104. Mirabet M, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Barrabes JA and Soler-Soler J. Thrombin increases cardiomyocyte acute cell death after ischemia and reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2005;39:277-83.
105. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003;124:265-32S.
106. Dahlback B and Villoutreix BO. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1:1525-34.
107. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem*. 1989;264:4743-6.
108. Ye J, Liu LW, Esmon CT and Johnson AE. The fifth and sixth growth factor-like domains of thrombomodulin bind to the anion-binding exosite of thrombin and alter its specificity. *J Biol Chem*. 1992;267:11023-8.
109. Perera L, Foley C, Darden TA, Stafford D, Mather T, Esmon CT and Pedersen LG. Modeling zymogen protein C. *Biophys J*. 2000;79:2925-43.
110. Weiler H and Isermann BH. Thrombomodulin. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1515-24.
111. Fukudome K, Ye X, Tsuneyoshi N, Tokunaga O, Sugawara K, Mizokami H and Kimoto M. Activation mechanism of anticoagulant protein C in large blood vessels involving the endothelial cell protein C receptor. *J Exp Med*. 1998;187:1029-35.
112. Gandrille S. Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis. *Haematologica*. 2008;93:812-6.
113. Bretschneider E, Uzonyi B, Weber AA, Fischer JW, Pape R, Lotzer K and Schror K. Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor. *Circ Res*. 2007;100:255-62.

114. Sturn DH, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani A, Fukudome K and Wiedermann CJ. Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood*. 2003;102:1499-505.
115. Taylor FB, Jr., Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G and Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood*. 2001;97:1685-8.
116. Ghosh S, Pendurthi UR, Steinoe A, Esmon CT and Rao LV. Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VIIa on endothelium. *J Biol Chem*. 2007;282:11849-57.
117. Regan LM, Mollica JS, Rezaie AR and Esmon CT. The interaction between the endothelial cell protein C receptor and protein C is dictated by the gamma-carboxyglutamic acid domain of protein C. *J Biol Chem*. 1997;272:26279-84.
118. Xu J, Qu D, Esmon NL and Esmon CT. Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:6038-44.
119. Villegas-Mendez A, Montes R, Ambrose LR, Warrens AN, Laffan M and Lane DA. Proteolysis of the endothelial cell protein C receptor by neutrophil proteinase 3. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5:980-8.
120. Liaw PC, Neuenschwander PF, Smirnov MD and Esmon CT. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:5447-52.
121. Guitton C, Gerard N, Sebille V, Bretonniere C, Zambon O, Villers D and Charreau B. Early rise in circulating endothelial protein C receptor correlates with poor outcome in severe sepsis. *Intensive care medicine*. 2011;37:950-6.
122. Bae JS, Yang L, Manithody C and Rezaie AR. The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. *Blood*. 2007;110:3909-16.
123. Dahlback B. Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261:12022-7.
124. Hackeng TM, van 't Veer C, Meijers JC and Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:21051-8.
125. Koppelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ and Bouma BN. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood*. 1995;86:1062-71.
126. van Wijnen M, Stam JG, van't Veer C, Meijers JC, Reitsma PH, Bertina RM and Bouma BN. The interaction of protein S with the phospholipid surface is essential for the activated protein C-independent activity of protein S. *Thrombosis and haemostasis*. 1996;76:397-403.
127. Esmon CT. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thrombosis and haemostasis*. 1993;70:29-35.
128. Kalafatis M, Rand MD and Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:31869-80.
129. Nicolaes GA and Dahlback B. Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22:530-8.
130. Rosing J, Hoekema L, Nicolaes GA, Thomassen MC, Hemker HC, Varadi K, Schwarz HP and Tans G. Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:27852-8.
131. Yegneswaran S, Smirnov MD, Safa O, Esmon NL, Esmon CT and Johnson AE. Relocating the active site of activated protein C eliminates the need for its protein S cofactor. A fluorescence resonance energy transfer study. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:5462-8.
132. Eaton D, Rodriguez H and Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*. 1986;25:505-12.

133. Regan LM, Lamphear BJ, Huggins CF, Walker FJ and Fay PJ. Factor IXa protects factor VIIIa from activated protein C. Factor IXa inhibits activated protein C-catalyzed cleavage of factor VIIIa at Arg562. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:9445-52.
134. Prendes MJ, Bielek E, Zechmeister-Machhart M, Vanyek-Zavadil E, Carroll VA, Breuss J, Binder BR and Geiger M. Synthesis and ultrastructural localization of protein C inhibitor in human platelets and megakaryocytes. *Blood*. 1999;94:1300-12.
135. Nishioka J, Ning M, Hayashi T and Suzuki K. Protein C inhibitor secreted from activated platelets efficiently inhibits activated protein C on phosphatidylethanolamine of platelet membrane and microvesicles. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:11281-7.
136. Riewald M and Ruf W. Orchestration of coagulation protease signaling by tissue factor. *Trends in cardiovascular medicine*. 2002;12:149-54.
137. Domotor E, Benzakour O, Griffin JH, Yule D, Fukudome K and Zlokovic BV. Activated protein C alters cytosolic calcium flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein C receptor and activation of protease activated receptor-1. *Blood*. 2003;101:4797-801.
138. Rezaie AR. The occupancy of endothelial protein C receptor by its ligand modulates the par-1 dependent signaling specificity of coagulation proteases. *IUBMB life*. 2011;63:390-6.
139. Bouwens EA, Stavenuiter F and Mosnier LO. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost*. 2013;11 Suppl 1:242-53.
140. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B and Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:11199-203.
141. Zingarelli B. Nuclear factor-kappaB. *Critical care medicine*. 2005;33:S414-6.
142. McVerry BJ and Garcia JG. Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate. *Journal of cellular biochemistry*. 2004;92:1075-85.
143. Feistritz C and Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood*. 2005;105:3178-84.
144. Bilbault P, Lavaux T, Launoy A, Gaub MP, Meyer N, Oudet P, Pottecher T, Jaeger A and Schneider F. Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients. *Critical care medicine*. 2007;35:69-75.
145. Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernandez JA, Griffin JH and Zlokovic BV. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron*. 2004;41:563-72.
146. Opal SM and Esmon CT. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Critical care*. 2003;7:23-38.
147. Joyce DE and Grinnell BW. Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB. *Critical care medicine*. 2002;30:S288-93.
148. Brueckmann M, Hoffmann U, De Rossi L, Weiler HM, Liebe V, Lang S, Kaden JJ, Borggrete M, Haase KK and Huhle G. Activated protein C inhibits the release of macrophage inflammatory protein-1-alpha from THP-1 cells and from human monocytes. *Cytokine*. 2004;26:106-13.
149. Elphick GF, Sarangi PP, Hyun YM, Hollenbaugh JA, Ayala A, Biffi WL, Chung HL, Rezaie AR, McGrath JL, Topham DJ, Reichner JS and Kim M. Recombinant human activated protein C inhibits integrin-mediated neutrophil migration. *Blood*. 2009;113:4078-85.
150. Dahlback B, Carlsson M and Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:1004-8.
151. Nicolaes GA, Tans G, Thomassen MC, Hemker HC, Pabinger I, Varadi K, Schwarz HP and Rosing J. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:21158-66.

152. Thorelli E, Kaufman RJ and Dahlback B. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood*. 1999;93:2552-8.
153. Castoldi E and Rosing J. APC resistance: biological basis and acquired influences. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010;8:445-53.
154. Smirnov MD, Safa O, Esmon NL and Esmon CT. Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin. *Blood*. 1999;94:3839-46.
155. Tran S, Norstrom E and Dahlback B. Effects of prothrombin on the individual activated protein C-mediated cleavages of coagulation factor Va. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:6648-55.
156. Roelse JC, Koopman MM, Buller HR, ten Cate JW, Montaruli B, van Mourik JA and Voorbert J. Absence of mutations at the activated protein C cleavage sites of factor VIII in 125 patients with venous thrombosis. *British journal of haematology*. 1996;92:740-3.
157. Norstrom EA, Tran S, Steen M and Dahlback B. Effects of factor Xa and protein S on the individual activated protein C-mediated cleavages of coagulation factor Va. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:31486-94.
158. Brugge JM, Tans G, Rosing J and Castoldi E. Protein S levels modulate the activated protein C resistance phenotype induced by elevated prothrombin levels. *Thrombosis and haemostasis*. 2006;95:236-42.
159. Dielis AW, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Hamulyak K, Ten Cate H and Rosing J. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2008;6:125-31.
160. Hackeng TM, Sere KM, Tans G and Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:3106-11.
161. Hackeng TM, Maurissen LF, Castoldi E and Rosing J. Regulation of TFPI function by protein S. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7 Suppl 1:165-8.
162. Taube J, McWilliam N, Luddington R, Byrne CD and Baglin T. Activated protein C resistance: effect of platelet activation, platelet-derived microparticles, and atherogenic lipoproteins. *Blood*. 1999;93:3792-7.
163. Camire RM, Kalafatis M, Simioni P, Girolami A and Tracy PB. Platelet-derived factor Va/Va Leiden cofactor activities are sustained on the surface of activated platelets despite the presence of activated protein C. *Blood*. 1998;91:2818-29.
164. de Visser MC, Rosendaal FR and Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood*. 1999;93:1271-6.
165. Tans G, van Hylckama Vlieg A, Thomassen MC, Curvers J, Bertina RM, Rosing J and Rosendaal FR. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test predicts for venous thrombosis in men and women. *British journal of haematology*. 2003;122:465-70.
166. Green D, Maliekel K, Sushko E, Akhtar R and Soff GA. Activated-protein-C resistance in cancer patients. *Haemostasis*. 1997;27:112-8.
167. Marchetti M, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Balducci D, Barbui T, Rosing J, Ten Cate H and Falanga A. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2008;112:4061-8.
168. Montravers P, Quintard H and Piednoir P. [Activated proteine C]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*. 2006;25:270-4.
169. Mosnier LO, Zlokovic BV and Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*. 2007;109:3161-72.
170. Taylor FB, Jr., Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S and Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon. *The Journal of clinical investigation*. 1987;79:918-25.
171. Dhainaut JF, Laterre PF, LaRosa SP, Levy H, Garber GE, Heiselman D, Kinasewitz GT, Light RB, Morris P, Schein R, Sollet JP, Bates BM, Utterback BG and Maki D. The clinical evaluation committee

- in a large multicenter phase 3 trial of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis (PROWESS): role, methodology, and results. *Critical care medicine*. 2003;31:2291-301.
172. Favory R, Lancel S, Marechal X, Tissier S and Neviere R. Cardiovascular protective role for activated protein C during endotoxemia in rats. *Intensive care medicine*. 2006;32:899-905.
173. Monnet X, Lamia B, Anguel N, Richard C, Bonmarchand G and Teboul JL. Rapid and beneficial hemodynamic effects of activated protein C in septic shock patients. *Intensive care medicine*. 2005;31:1573-6.
174. Donati A, Damiani E, Botticelli L, Adrario E, Lombrano MR, Domizi R, Marini B, Van Teeffelen JW, Carletti P, Girardis M, Pelaia P and Ince C. The aPC treatment improves microcirculation in severe sepsis/septic shock syndrome. *BMC anesthesiology*. 2013;13:25.
175. Favory R, Poissy J, Alves I, Guerry MJ, Lemyze M, Parmentier-Decrucq E, Duburcq T and Mathieu D. Activated protein C improves macrovascular and microvascular reactivity in human severe sepsis and septic shock. *Shock*. 2013;40:512-8.
176. Abraham E, Laterre PF, Garg R, Levy H, Talwar D, Trzaskoma BL, Francois B, Guy JS, Bruckmann M, Rea-Neto A, Rossaint R, Perrotin D, Sablotzki A, Arkins N, Utterback BG, Macias WL and Administration of Drotrecogin Alfa in Early Stage Severe Sepsis Study G. Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *The New England journal of medicine*. 2005;353:1332-41.
177. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, Gardlund B, Marshall JC, Rhodes A, Artigas A, Payen D, Tenhunen J, Al-Khalidi HR, Thompson V, Janes J, Macias WL, Vangerow B, Williams MD and Group P-SS. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *The New England journal of medicine*. 2012;366:2055-64.
178. Ranieri VM, Thompson BT, Finfer S, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Gardlund B, Marshall JC, Rhodes A and Committee P-SAS. Unblinding plan of PROWESS-SHOCK trial. *Intensive care medicine*. 2011;37:1384-5.
179. Annane D, Timsit JF, Megarbane B, Martin C, Misset B, Mourvillier B, Siami S, Chagnon JL, Constantin JM, Petitpas F, Souweine B, Amathieu R, Forceville X, Charpentier C, Tesniere A, Chastre J, Bohe J, Colin G, Cariou A, Renault A, Brun-Buisson C, Bellissant E and Investigators AT. Recombinant human activated protein C for adults with septic shock: a randomized controlled trial. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187:1091-7.
180. Regnault V and Levy B. Recombinant activated protein C in sepsis: endothelium protection or endothelium therapy? *Critical care*. 2007;11:103.
181. Morel O, Toti F, Jesel L and Freyssinet JM. Mechanisms of microparticle generation: on the trail of the mitochondrion! *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2010;36:833-44.
182. Piccin A, Murphy WG and Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood reviews*. 2007;21:157-71.
183. Navasiolava NM, Dignat-George F, Sabatier F, Larina IM, Demiot C, Fortrat JO, Gauquelin-Koch G, Kozlovskaya IB and Custaud MA. Enforced physical inactivity increases endothelial microparticle levels in healthy volunteers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H248-56.
184. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M and Italiano JE, Jr. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood*. 2009;113:1112-21.
185. Zwaal RF, Comfurius P and Bevers EM. Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochimica et biophysica acta*. 1992;1180:1-8.
186. Thery C, Zitvogel L and Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews Immunology*. 2002;2:569-79.
187. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS and Hebbel RP. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003;102:2678-83.

188. Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G and Hivroz C. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *Journal of immunology*. 2002;168:3235-41.
189. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T and Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263:18205-12.
190. Nguyen KT, Frye SR, Eskin SG, Patterson C, Runge MS and McIntire LV. Cyclic strain increases protease-activated receptor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2001;38:1038-43.
191. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR and Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:1512-8.
192. Markiewicz M, Richard E, Marks N and Ludwicka-Bradley A. Impact of endothelial microparticles on coagulation, inflammation, and angiogenesis in age-related vascular diseases. *J Aging Res*. 2013;2013:734509.
193. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J and Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*. 2002;99:3962-70.
194. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F and Freyssinet JM. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:2594-604.
195. Owens AP, 3rd and Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circulation research*. 2011;108:1284-97.
196. Gilbert GE, Sims PJ, Wiedmer T, Furie B, Furie BC and Shattil SJ. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266:17261-8.
197. Furie B and Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends in molecular medicine*. 2004;10:171-8.
198. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV and Ataullakhanov FI. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;97:425-34.
199. Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS, Sabatier F and Dignat-George F. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013;11 Suppl 1:24-35.
200. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P and Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005;106:1604-11.
201. Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC and Furie B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood*. 2004;104:3190-7.
202. Drake TA, Cheng J, Chang A and Taylor FB, Jr. Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am J Pathol*. 1993;142:1458-70.
203. Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B and Key NS. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood*. 2004;103:4545-53.
204. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL and Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thrombosis research*. 2003;109:175-80.
205. Nomura S, Ozaki Y and Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thrombosis research*. 2008;123:8-23.
206. Broze GJ, Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thrombosis and haemostasis*. 1995;74:90-3.

207. Maroney SA, Haberichter SL, Friese P, Collins ML, Ferrel JP, Dale GL and Mast AE. Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets. *Blood*. 2007;109:1931-7.
208. Kushak RI, Nestoridi E, Lambert J, Selig MK, Ingelfinger JR and Grabowski EF. Detached endothelial cells and microparticles as sources of tissue factor activity. *Thrombosis research*. 2005;116:409-19.
209. Horstman LL and Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Critical reviews in oncology/hematology*. 1999;30:111-42.
210. Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schomig A and Ott I. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thrombosis and haemostasis*. 2005;93:35-9.
211. Rijken DC and Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7:4-13.
212. Lacroix R, Plawinski L, Robert S, Doeuve L, Sabatier F, Martinez de Lizarrondo S, Mezzapesa A, Anfosso F, Leroyer AS, Poullin P, Jourde N, Njock MS, Boulanger CM, Angles-Cano E and Dignat-George F. Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica*. 2012;97:1864-72.
213. Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D and FitzGerald GA. Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:7545-56.
214. Lynch SF and Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *British journal of haematology*. 2007;137:36-48.
215. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S and Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001;158:277-87.
216. Mesri M and Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:23111-8.
217. Morel O, Hugel B, Jesel L, Lanza F, Douchet MP, Zupan M, Chauvin M, Cazenave JP, Freyssinet JM and Toti F. Sustained elevated amounts of circulating procoagulant membrane microparticles and soluble GPV after acute myocardial infarction in diabetes mellitus. *Thrombosis and haemostasis*. 2004;91:345-53.
218. Meziari F, Delabranche X, Asfar P and Toti F. Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis? *Critical care*. 2010;14:236.
219. Forlow SB, McEver RP and Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*. 2000;95:1317-23.
220. Jy W, Mao WW, Horstman L, Tao J and Ahn YS. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood cells, molecules & diseases*. 1995;21:217-31; discussion 231a.
221. Mesri M and Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *Journal of immunology*. 1998;161:4382-7.
222. Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, Sabatier F, Simoncini S, Njock SM, Jourde N, Brunet P, Camoin-Jau L, Sampol J and Dignat-George F. Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis*. 2010;104:456-63.
223. Heitzer T, Baldus S, von Kodolitsch Y, Rudolph V and Meinertz T. Systemic endothelial dysfunction as an early predictor of adverse outcome in heart failure. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:1174-9.
224. Bulut D, Maier K, Bulut-Streich N, Borgel J, Hanefeld C and Mugge A. Circulating endothelial microparticles correlate inversely with endothelial function in patients with ischemic left ventricular dysfunction. *Journal of cardiac failure*. 2008;14:336-40.

225. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G and Ahn YS. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension*. 2003;41:211-7.
226. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S and Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:112-6.
227. Nozaki T, Sugiyama S, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, Konishi M, Matsubara J, Akiyama E, Sumida H, Matsui K, Jinnouchi H and Ogawa H. Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *European journal of heart failure*. 2010;12:1223-8.
228. Walenta K, Schwarz V, Schirmer SH, Kindermann I, Friedrich EB, Solomayer EF, Sliwa K, Labidi S, Hilfiker-Kleiner D and Bohm M. Circulating microparticles as indicators of peripartum cardiomyopathy. *European heart journal*. 2012;33:1469-79.
229. Montoro-Garcia S, Shantsila E, Wrigley BJ, Tapp LD, Abellan Aleman J and Lip GY. Small-size Microparticles as Indicators of Acute Decompensated State in Ischemic Heart Failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2015.
230. Ten Cate H. Thrombin generation in clinical conditions. *Thrombosis research*. 2012;129:367-70.
231. Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S and ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res*. 2009;82:392-403.
232. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T and Beguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:4-15.
233. Regnault V, Beguin S, Wahl D, de Maistre E, Coenraad Hemker H and Lecompte T. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost*. 2003;89:208-12.
234. Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhoury K, Bouriche T, Judicone C, Wischhusen J, Arnaud L and Dignat-George F. High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles--brief report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32:1054-8.
235. Chung I and Lip GY. Platelets and heart failure. *European heart journal*. 2006;27:2623-31.
236. Vanschoonbeek K, Feijge MA, Van Kampen RJ, Kenis H, Hemker HC, Giesen PL and Heemskerk JW. Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: subject-dependent variation in thrombogram characteristics. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2004;2:476-84.
237. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE and Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2001;85:639-46.
238. Sinning JM, Losch J, Walenta K, Bohm M, Nickenig G and Werner N. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *European heart journal*. 2011;32:2034-41.
239. Suades R, Padro T, Crespo J, Ramaiola I, Martin-Yuste V, Sabate M, Sans-Rosello J, Sionis A and Badimon L. Circulating microparticle signature in coronary and peripheral blood of ST elevation myocardial infarction patients in relation to pain-to-PCI elapsed time. *Int J Cardiol*. 2015;202:378-387.
240. Mege D, Panicot-Dubois L, Ouaisi M, Robert S, Sielezneff I, Sastre B, Dignat-George F and Dubois C. The origin and concentration of circulating microparticles differ according to cancer type and evolution: A prospective single-center study. *Int J Cancer*. 2015.
241. Simak J, Holada K and Vostal JG. Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC Cell Biol*. 2002;3:11.
242. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A and Mallat Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation*. 2001;104:2649-52.

243. Ikezoe T. Thrombomodulin/activated protein C system in septic disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care*. 2015;3:1.
244. Tournier A, Wahl D, Chaouat A, Max JP, Regnault V, Lecompte T and Chabot F. Calibrated automated thrombography demonstrates hypercoagulability in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Thromb Res*. 2010;126:e418-22.
245. Grabowski EF, Reininger AJ, Petteruti PG, Tsukurov O and Orkin RW. Shear stress decreases endothelial cell tissue factor activity by augmenting secretion of tissue factor pathway inhibitor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21:157-62.
246. Higuchi Y, Kubota T, Koyanagi M, Maeda T, Feldman AM and Makino N. Upregulation of anticoagulant proteins, protein S and tissue factor pathway inhibitor, in the mouse myocardium with cardio-specific TNF-alpha overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H2352-62.
247. Hosaka Y, Takahashi Y and Ishii H. Thrombomodulin in human plasma contributes to inhibit fibrinolysis through acceleration of thrombin-dependent activation of plasma procarboxypeptidase B. *Thrombosis and haemostasis*. 1998;79:371-7.
248. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1800-14.
249. Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G and Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood*. 2005;105:1515-22.

Résumé

Malgré le bénéfice observé par de nouvelles thérapeutiques, le devenir des patients hospitalisés pour une insuffisance cardiaque aiguë (ICA) reste sombre. Ce pronostic péjoratif est en partie influencé par la survenue fréquente d'événements thrombotiques qui sont à parfois directement à l'origine du décès des patients. Les mécanismes physiopathologiques de cette hypercoagulabilité pourraient être considérés comme des cibles thérapeutiques d'intérêt. L'objectif de ce travail est de démontrer qu'une défaillance des systèmes biologiques contrôlant la thrombose est impliquée dans la physiopathologie de l'ICA. Notre travail met en évidence la présence d'une hypercoagulabilité de ces patients qui se caractérise par une génération de thrombine exagérée pendant la phase aiguë de la décompensation cardiaque et qui se normalise ensuite à distance. Cette élévation de la génération de thrombine est la conséquence d'une augmentation du nombre de microparticules procoagulantes circulantes et d'une altération de l'activité d'un système naturel anticoagulant représenté par la voie de la protéine C.

Mots clés : Insuffisance cardiaque aiguë, protéine C activée, microparticules, génération de thrombine

Abstract

Acute heart failure (AHF) is a syndrome with an increasing prevalence and a high mortality whose management is challenging given the incomplete understanding of its pathophysiology. This doomed prognosis is partly influenced by thromboembolic events and is often the cause of death. The present study demonstrates a significant shift towards a prothrombotic biological profile at the acute phase of decompensated heart failure. Using a comprehensive exploration of the dynamics of thrombin generation and inhibition, we found an increased overall thrombin-generating capacity in AHF patients during hospital course. Both increased in circulating procoagulant microparticles and impairment in the downregulation of thrombin generation by the anticoagulant C protein pathway represent mechanisms contributing to this hypercoagulable state in AHF.

Keys words: acute heart failure, activated C protein, thrombin generation, microparticles