



**HAL**  
open science

# Rôle des cellules musculaires lisses vasculaires et des intégrines dans la génération de thrombine dans le compartiment sanguin et vasculaire

Amel Mohamadi

► **To cite this version:**

Amel Mohamadi. Rôle des cellules musculaires lisses vasculaires et des intégrines dans la génération de thrombine dans le compartiment sanguin et vasculaire. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0339 . tel-01637278

**HAL Id: tel-01637278**

**<https://theses.hal.science/tel-01637278>**

Submitted on 17 Nov 2017

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

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

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

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

**par Amel MOHAMADI**

**Rôle des cellules musculaires lisses vasculaires et des intégrines  
dans la génération de thrombine dans le compartiment sanguin et  
vasculaire**

**Soutenue le 21 octobre 2016**

**Membres du jury :**

<b>Rapporteurs :</b>	<b>Mme Catherine LEON</b>	<b>Directrice de recherche, UMR_S 949, Strasbourg</b>
	<b>M. Peter LENTING</b>	<b>Directeur de recherche, UMR_S 1176, Kremlin-Bicêtre</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>M. Daniel HENRION</b>	<b>Directeur de recherche, UMR_S 1083 / UMR CNRS 6214, Angers</b>
	<b>M. David MOULIN</b>	<b>Chargé de recherche, UMR CNRS 7365, Nancy</b>
	<b>Mme Véronique REGNAULT</b>	<b>Directrice de recherche, UMR_S 1116, Nancy Université, directrice de thèse</b>
	<b>Mme Nathalie MERCIER</b>	<b>Maître de conférences, UMR_S 1116, Nancy Université, co-directrice de thèse</b>

## Remerciements

Après trois belles années jalonnées de souvenirs éparpillés tout au long de la thèse que ce soit dans la région ou dans d'autres contrées du globe, d'expériences plus ou moins fructueuses, de joies, de doutes, de réflexions scientifiques ou plus philosophiques, vient le temps pour moi de prendre un autre chemin. Avant de plier bagages, je vais m'arrêter un moment pour déposer sur le papier les quelques mots qui me viennent.

Je tiens tout d'abord à remercier le **Dr Patrick Lacolley**, Directeur de l'unité UMR\_S1116, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je lui témoigne mon plus profond respect pour son dynamisme, pour tous ses conseils scientifiques et professionnels toujours éclairés et pour sa grande implication quel que soit le projet. Je le remercie à titre personnel pour toutes ces fois où le sort s'est « acharné » sur moi et pour lesquelles il a trouvé les solutions mais que je n'oublie pas (que ce soit une farouche dent ou un sac qui prend la poudre d'escampette).

Je remercie le **Dr Véronique Regnault**, ma directrice de thèse, pour m'avoir encadré de la plus belles des manières tantôt avec souplesse tantôt avec fermeté et c'est avec beaucoup d'émotion que je lui témoigne ma gratitude. Je la remercie pour toutes ses qualités scientifiques qui ne sont même plus à prouver telles que sa grande rigueur, son implication, ses conseils, sa réflexion scientifique très poussée, ses critiques constructives qui m'ont permis de m'améliorer ou encore son aide durant les manipulations et la rédaction. Ses précieux conseils me seront utiles pour la suite de ma carrière. Je tiens également à souligner ses qualités humaines, sa gentillesse, sa compréhension et ses petites attentions qui font toute la différence. C'était un réel plaisir d'aller en congrès au pays des caribous avec elle, j'en sors grandis et la tête remplis de souvenirs, de péripéties ou d'anecdotes. Merci encore.

Je remercie également le **Dr Nathalie Mercier**, ma co-directrice de thèse, pour son soutien, son aide, son écoute, sa grande disponibilité et sa dose de bonne humeur. Merci d'avoir été là pour répondre à mes questions. Je la remercie également pour son aide durant la rédaction. J'ai été très fière d'être son étudiante.

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse :

Le **Dr Catherine Léon** pour l'honneur d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Le **Dr Peter Lenting** pour avoir accepté de juger mon travail de thèse et d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse dont les réunions ont été très enrichissantes et m'ont permis de prendre un vrai recul par rapport à mes travaux mais également d'aborder mes perspectives scientifiques avec plus de rigueur.

Le **Dr Daniel Henrion** pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans mon jury en tant qu'examinateur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma plus profonde gratitude.

Le **Dr David Moulin** de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examinateur. Je le remercie également pour ses précieuses réflexions et idées scientifiques qu'il a pu m'apporter en tant que membre de mon comité de suivi de thèse.

Merci au **Dr. Huguette Louis** et à **Cécile Lakomy** pour leur travail exceptionnel et leur précieuse aide expérimentale. A titre personnel, je remercie Huguette pour son travail (cytométrie en flux, génotypage et j'en passe), ses réflexions scientifiques mais également pour sa bonne humeur ensoleillée. Je tiens également à souligner sa droiture dans sa réflexion et ses conseils justes. Je remercie Cécile pour son

aide en thrombinographie, en dosage, en culture.... et pour son incroyable réactivité, sans oublier sa bonne humeur et son humour qui en font quelqu'un de très agréable.

Je remercie **Véronique Laplace** pour s'être occupé de mes souris avec sérieux et dévouement ainsi que son calme quel que soit les circonstances.

Je remercie **Céline Leroy** pour sa bonne humeur et sa grande sympathie.

Merci au **Dr Zhor Ramdane-Cherif** pour nos discussions scientifiques ou un peu moins scientifiques, pour les moments passés à travailler dans la salle d'expérimentation mais toujours ponctués de bonne humeur. Je la remercie également pour sa clairvoyance et sa générosité et pour tous ces bons moments.

Je remercie le **Pr. Simon Thornton** pour toutes les réponses qu'il a su m'apporter concernant l'expérimentation animale et pour toutes ses corrections d'abstract et de présentations en anglais. Un mot me vient à l'esprit...Water !

Je remercie **Audrey Isch** pour ses conseils administratifs, sa bonne humeur et également pour sa sympathie.

Je tiens à remercier tous les doctorantes en fin de thèse. Je remercie **Narimane Al Kattany** pour sa gentillesse, nos longues conversations et pour son amitié. Je remercie **Delphine Lambert** pour sa bonne humeur contagieuse, ses talents de cuisinière hors-pair, ses attentions (merci au petit pain au chocolat, je tenais à le mettre) et pour sa confiance. Je tiens à remercier **Ekaterina Belozertseva** pour nos discussions, nos débats et pour m'avoir tenu compagnie dans le bureau. Je remercie **Chaojie Wei** pour sa gentillesse, son écoute et son sourire. Je souhaite un bon courage à **Yun** qui débute sa thèse.

Je remercie les doctorants qui débutent leur thèse ou qui sont en cours de route. Je remercie **Mélusine Didelot** pour avoir été une sympathique et dynamique collègue de bureau et pour avoir abreuvé notre plante des doctorants. Je remercie **Camille Rouillon** d'avoir été un bon padawan, sérieux, rigueur et maturité sont ses atouts. Je remercie les doctorants du laboratoire INOTREM pour les petits moments sympathiques : **Kévin Carrasco, Lucie Jolly, Caroline Laroye**.

Je remercie les postdoctorants présents ou partis. Je remercie le **Dr. Simon Toupance** pour ses conseils scientifiques très pointus mais aussi pour son sens de la dérision (et de l'auto-dérision) qui a égayé nos journées. Je remercie le **Dr. Benoît Langlois** pour toutes ses critiques scientifiques, son aide majeure pour les expériences et pour sa franchise. Je remercie le **Dr. Mustapha Bourhim** pour tous ses conseils d'une très grande sagesse et pour toutes nos expériences faites en commun. Je souhaite un bon courage aux nouveaux : le **Dr. John Pirault**, le **Dr. George Lindesay** et le **Dr. Morel Worou** ainsi qu'une année fructueuse.

Je souhaite un bon courage à **Margaux Schmitt** (ou Dr Schmitt) et **Mélanie Folio**. Merci pour votre bonne humeur.

Je remercie les doctorants du laboratoire ayant déjà soutenu. Je remercie le **Dr. Jérémy Lagrange** pour son soutien, sa persévérance, son authenticité ainsi que pour son dévouement dans l'association A-Team of BioSE. Je remercie le **Dr. Anna Filip** pour sa gentillesse durant sa thèse.

Je remercie toutes les personnes qui ont fait une halte par le laboratoire avant de poursuivre leur chemin. Je remercie **Sophie Schwebel** pour sa bonne humeur et pour toutes nos journées « Juke-Box », c'était un réel plaisir de la connaître. Je remercie **Marc-Damien Lorenzo Rodriguez** pour sa bonne

humeur et sa folie parfois contagieuse et également pour sa grande sympathie. Je remercie **Stéphanie Makhoul** pour sa grande gentillesse et son étonnant altruisme. Merci à **Elodie Rousseau** pour sa sympathie et sa droiture. Enfin, je remercie toutes les autres personnes qui ont été de passage : **Nicolas Clavère** (le mot magique : « citron »), **Clémence, Marie, Oumaima, Gonzalo, Reda, David...**

Je remercie également les personnes qui m'ont appris certaines techniques expérimentales dans leur laboratoires ou qui se sont déplacés: le **Dr. Frédéric Adam**, le **Dr. Stéphane Potteaux**, le **Pr. Laurent Monassier**, le **Pr. Jean-Baptiste Michel** et le **Dr. Kamel Boukais**. Je les remercie pour leur patience.

Je remercie tous les membres de l'association **A-Team of BioSE**. Je remercie tous les présidents (**Jérémy, Antoine, Léonore, Laurie**) ainsi que tous les membres du bureau qui se sont relayés (**Cécile, Benoît, Fanny, Mathilde, Paul, Arnaud, Daphné....**).

Je remercie également les membres du laboratoire UMR\_1140 et les personnes rencontrées (le **Dr. Catherine Boisson-Vidal, Anna, Elise, Zack, Vivi, Oscar, Tristan...**et tous les autres).

Je remercie mes amis qui restent fidèles malgré les absences. **Jade** dont sa phrase résonne encore en tête « *L'important n'est pas de savoir d'où l'on vient mais où l'on va.* », **Nicolas, Melek, Chabha, Aurore...**

Enfin, je voudrais remercier ma famille qui a su être à l'écoute, et être patient durant cette période de thèse et encore plus durant la rédaction.

*Je remercie toutes les petites mains qui feuilleteront mon manuscrit.*

A ma famille,

Je leur dédie cette thèse qu'elle soit le symbole de toute mon affection.

*C'est le courage que l'on a de prendre un chemin qui le fait apparaître.*

*Et qui nous en fait entrevoir d'autres.*

Paulo Coelho

*Il est des êtres dont le destin est de se croiser.*

*Où qu'ils soient. Où qu'ils aillent. Un jour, ils se rencontrent.*

Claudie Gallais



Liste des figures .....	I
Liste des tableaux.....	IV
Abréviations .....	VI
Synthèse bibliographique.....	1
<b>I. Génération de thrombine plasmatique et tissulaire .....</b>	<b>2</b>
1) Génération de thrombine dans le compartiment plasmatique .....	2
2) Génération de thrombine dans le compartiment pariétale.....	6
3) La fibrinolyse.....	7
<b>II. Les cellules : support de la génération de thrombine .....</b>	<b>8</b>
1) Les plaquettes .....	8
a) L'activation plaquettaire en réponse à une brèche vasculaire .....	9
b) L'adhérence et le changement de forme .....	9
c) L'agrégation plaquettaire .....	11
d) La sécrétion.....	12
e) La microvésiculation .....	13
2) La média : les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) .....	14
a) Caractérisation des CMLVs.....	14
b) Origine des CMLVs.....	15
c) Modulation phénotypique .....	15
d) Mécanismes de régulation des CMLVs.....	17
e) CMLVs et génération de thrombine .....	17
f) CMLVs et génération de thrombine dans les conditions physiopathologiques.....	19
3) L'intima : les cellules endothéliales (CE) .....	20
<b>III. Les intégrines et leurs rôles dans la génération de thrombine .....</b>	<b>20</b>
1) Généralités sur les intégrines .....	20
2) L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ .....	22
a) Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ .....	22
b) Fonctions des intégrines .....	22
c) Rôles de l'intégrines $\alpha_v\beta_3$ .....	25
3) L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ .....	27
4) Thrombine et activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ .....	27
<b>IV. Déterminants génétiques cardiovasculaires et modèles de thromboses .....</b>	<b>27</b>
1) Les déterminants génétiques impliqués dans les pathologies cardiovasculaires .....	27
a) Maladies héréditaires monogéniques.....	28
b) Maladies génétiques multifactorielles .....	28
2) Modèles animaux de thromboses .....	30
<b>Objectif général et stratégies d'études.....</b>	<b>34</b>
<b>Bien-être animal .....</b>	<b>37</b>
1) La règle des 3 R .....	38
2) Les points limites .....	38
<b>Méthodes.....</b>	<b>39</b>
1) Modèle de thrombose physiologique à la queue .....	40
2) Modèle de temps de saignement à la queue et mesure de l'hémoglobine.....	42

<b>3) Modèle de thrombose carotidienne induite par du chlorure ferrique.....</b>	<b>43</b>
a) Préparation des animaux .....	43
b) Visualisation du flux avant l'application du chlorure ferrique (FeCl <sub>3</sub> ).....	43
c) Visualisation du flux après l'application du FeCl <sub>3</sub> .....	44
<b>4) Isolement et mise en culture des cellules musculaires lisses aortiques de souris.....</b>	<b>45</b>
a) Isolement des cellules et mise en culture .....	45
b) Entretien des cellules .....	45
c) Immunocytochimie .....	46

## Chapitre 1 : Implication des CMLVs dans la génération de thrombine et la thrombose artérielle dans l'hypertension artérielle et le syndrome métabolique..... 47

<b>I. Introduction et rationnel de l'étude.....</b>	<b>48</b>
<b>1) L'hypertension artérielle .....</b>	<b>48</b>
a) Hémostase de l'hypertension.....	48
b) Le modèle de rats spontanément hypertendu (SHR).....	49
<b>2) Le syndrome métabolique .....</b>	<b>50</b>
a) Hémostase et SMet.....	50
b) Le rat Zucker, modèle animal de syndrome métabolique.....	51
<b>II. Objectifs de l'étude .....</b>	<b>52</b>
<b>1) Génération de thrombine et thrombose artérielle dans le modèle du rat spontanément hypertendu (SHR) (Article 1) .....</b>	<b>52</b>
<b>2) Intégrine <math>\alpha_v\beta_3</math> des CMLVs et hypercoagulabilité du rat Zucker, modèle de syndrome métabolique (Article 2).....</b>	<b>53</b>
<b>III. Articles, résultats principaux et résultats complémentaires... ..</b>	<b>54</b>
<b>1) Article 1 : Vascular Smooth muscle cells are responsible for a prothrombotic phenotype of fatty spontaneously hypertensive rat arteries (publié dans ATVB).....</b>	<b>54</b>
<b>2) Article 2 : Fat fatty acids increase thrombin generation and decrease fibrinolysis enhancing vascular inflammation in aged Zucker rats (en cours de soumission) .....</b>	<b>71</b>
<b>IV. Discussions et conclusions .....</b>	<b>108</b>
<b>1) Phénotype prothrombotique de la paroi artérielle dans un contexte d'hypertension (SHR) .....</b>	<b>108</b>
<b>2) Contribution des effets métaboliques et du vieillissement sur la génération de thrombine tissulaire et plasmatique (Zucker).....</b>	<b>111</b>
<b>3) Conclusion générale (articles 1 et 2) .....</b>	<b>113</b>

## Chapitre 2 : Rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des CMLVs sur le phénotype de la coagulation *in vitro* (génération de thrombine) et *in vivo* (modèles de saignement et de thrombose) chez la souris et caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux ..... 114

<b>I. Intégrines <math>\alpha_v</math> des cellules musculaires lisses vasculaires et génération de thrombine dans le compartiment sanguin et pariétal... ..</b>	<b>115</b>
<b>1) Rationnel et objectif de l'étude.....</b>	<b>115</b>
a) Contexte de l'étude.....	115
b) Objectif de l'étude .....	115
c) Le modèle animal : modèle de souris invalidées de façon spécifique et inductible pour la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines .....	116
<b>2) Résultats principaux (non publiés) .....</b>	<b>118</b>

a) Paramètres généraux .....	118
a.1 Vérification de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha_v$ dans la carotide et dans les CMLVs .....	118
a.2 Réactivité plaquettaire .....	119
b) Etude de la coagulation <i>in vitro</i> des souris invalidées pour la sous-unité $\alpha_v$ .....	121
b.1 Génération de thrombine en présence d'anneaux aortique .....	121
b.2 La génération de thrombine à la surface des CMLVs.....	122
b.3 Génération de thrombine en sang total et en plasma riche ou pauvre en plaquettes .....	122
b.4 Dosage des facteurs anticoagulants dans le plasma de la souris .....	124
c) Implication de la sous-unité $\alpha_v$ dans la coagulation <i>in vivo</i> : modèle de thrombose carotidienne des souris invalidées $\alpha_v$ pour et traitées à l'angiotensine II .....	125
<b>3) Discussion et conclusion .....</b>	<b>126</b>
<b>II. Caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux. ....</b>	<b>129</b>
<b>1) Rationnel et objectif de l'étude .....</b>	<b>129</b>
a) Contexte de l'étude.....	129
b) Stratégie de synthèse .....	130
c) Objectif de l'étude.....	131
<b>2) Effet des peptides RGD sur l'agrégation plaquettaire (Article 3) .....</b>	<b>132</b>
a) 'Click' glycosylation of peptides through cysteine propargylation and CuAAC (publié dans Bioorg. and Med. Chem.)... ..	132
b) Effet des peptides RGD sur l'adhérence des CMLVs à la vitronectine et sur la génération de thrombine à la surface des CMLVs (données non publiées) .....	144
b.1 Effet des peptides RGD sur l'adhérence des CMLVs de rats à la vitronectine.....	144
b.2 Effet des peptides RGD sur la génération de thrombine à la surface des CMLVs de rats.....	147
<b>3) Discussion et conclusion .....</b>	<b>149</b>
<b>Chapitre 3 : Variants dans le locus 9p21, anomalies plaquettaires et de la génération de thrombine... ..</b>	<b>151</b>
<b>I. Introduction et rationnel de l'étude .....</b>	<b>152</b>
<b>1) Contexte de l'étude .....</b>	<b>152</b>
<b>2) Pathophysiologie des maladies liées au locus 9p21 .....</b>	<b>152</b>
a) Pathophysiologie.....	152
b) Modèle murin de la délétion du locus 9p21.....	153
<b>3) Objectifs de l'étude .....</b>	<b>154</b>
<b>II. Article 4 : Résultats 9p21 (non publiés).....</b>	<b>155</b>
<b>1) Résultats.....</b>	<b>155</b>
<b>2) Figures et légendes de l'article 4 (9p21) .....</b>	<b>159</b>
<b>III. Discussion et conclusion.....</b>	<b>167</b>
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>170</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>174</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>189</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>211</b>

## **LISTE DES FIGURES**

---

<b>Figure 1</b> : Schéma de l'activation de la prothrombine en thrombine.....	4
<b>Figure 2</b> : Présentation schématique de la cascade de la coagulation sanguine .....	5
<b>Figure 3</b> : Ultrastructure plaquettaire .....	8
<b>Figure 4</b> : Adhérence des plaquettes à la membrane sous flux... ..	10
<b>Figure 5</b> : Implication des interactions récepteur-ligand dans l'agrégation plaquettaire sous un flux de cisaillement élevé .....	12
<b>Figure 6</b> : Le phénotype contractile ou synthétique des CMLVs.....	16
<b>Figure 7</b> : Schéma de la génération de thrombine à la surface des CMLVs.....	18
<b>Figure 8</b> : Classification des intégrines .....	21
<b>Figure 9</b> : Structures repliées et étendues des intégrines .....	22
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique des deux conformations de l'intégrine .....	24
<b>Figure 11</b> : Voies générales de signalisation des intégrines et les facteurs de croissance. ....	25
<b>Figure 12</b> : Interactions gène-environnement impliquées dans les maladies cardiovasculaires multifactorielles.....	29
<b>Figure 13</b> : Schéma de thrombose carotidienne induite par le FeCl <sub>3</sub> chez la souris.....	32
<b>Figure 14</b> : Les ions ferriques traversent l'endothélium vers la lumière du vaisseau. ....	33
<b>Figure 15</b> : Schéma récapitulatif de la procédure de formation et de l'imagerie d'un thrombus physiologique à la queue. ....	41
<b>Figure 16</b> : Schéma du modèle de saignement à la queue.....	42
<b>Figure 17</b> : Image échographique de la carotide droite en M-mode... ..	43
<b>Figure 18</b> : Image échographique du flux avant l'application du FeCl <sub>3</sub> sur la carotide. ....	43
<b>Figure 19</b> : Image échographique du flux après l'application du FeCl <sub>3</sub> sur la carotide. ....	44
<b>Figure 20</b> : Schéma de la génération des souris invalidées pour la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines dans les CMLVs.....	117
<b>Figure 21</b> : Immunohistochimie pour les sous unités $\alpha_v$ et $\alpha_5$ .....	118
<b>Figure 22</b> : Immunocytochimie de la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines à la surface de CMLVs mises en culture à partir d'aorte de souris contrôles (CT) et invalidées ( $\alpha_v^{\text{SMKO}}$ )... ..	119
<b>Figure 23</b> : Agrégation plaquettaire .....	121
<b>Figure 24</b> : Génération de thrombine à la surface d'anneaux aortiques de souris invalidées et contrôles.....	122
<b>Figure 25</b> : Génération de thrombine à la surface des CMLVs.....	122
<b>Figure 26</b> : Génération de thrombine dans le sang total, le PRP et le PDP de souris invalidées et contrôles.....	123

<b>Figure 27</b> : Mesures échographiques du flux sanguin dans la carotide de la souris après application de FeCl <sub>3</sub> .....	125
<b>Figure 28</b> : Synthèse de glycopeptides marqués au Fluor-18.....	130
<b>Figure 29</b> : Séquence et structure des glyco-peptides étudiés.....	144
<b>Figure 30</b> : Inhibition de l'adhérence des CMLVs de rat à la vitronectine par des peptides de référence cRGDfV et RGD .....	146
<b>Figure 31</b> : Inhibition de la génération de thrombine à la surface des CMLVs de rat.....	148
<b>Figure 32</b> : Modèles de saignement et de thromboses chez les souris sauvages et avec délétion Chr4 <sup>Δ70kb</sup> .....	159
<b>Figure 33</b> : Fonction plaquettaire des souris sauvages et avec délétion Chr4 <sup>Δ70kb</sup> .....	161
<b>Figure 34</b> : Génération de thrombine plasmatique et tissulaire chez les souris sauvages et avec délétion Chr4 <sup>Δ70kb</sup> .....	163
<b>Figure 35</b> : Valeurs d'ETP et de vitesse de l'onde de pouls en fonction de la présence d'allèles de risque du locus 9p21 dans la population Arteos .....	165

## **LISTE DES TABLEAUX**

---

<b>Tableau 1</b> : La famille des intégrines .....	26
<b>Tableau 2</b> : Comparaison entre les plaquettes de la souris et de l'homme.....	31
<b>Tableau 3</b> : Numération sanguine des souris invalidées et des souris contrôles.....	119
<b>Tableau 4</b> : Expression des glycoprotéines plaquettares .....	120
<b>Tableau 5</b> : Taux de thrombomoduline soluble et activité du TFPI dans le plasma de la souris $\alpha_v^{SMKO}$ ou CT.....	124
<b>Tableau 6</b> : Temps moyen d'occlusion de la carotide et poids moyen du thrombus en réponse à l'application du $FeCl_3$ .....	125
<b>Tableau 7</b> : Inhibition par les glycopeptides CC707, YC625 et SL93 et les peptides de référence cRGDfV et RGD de l'adhérence des CMLVs à la vitronectine .....	147
<b>Tableau 8</b> : Dosage des facteurs de coagulation dans le plasma des souris CT et KO.....	158
<b>Tableau 9</b> : Distribution dans deux populations humaines des génotypes pour 7 variants situés dans le locus 9p21.....	166



## ABREVIATIONS

---

<b>AA</b> : Acide arachidonique	<b>FVIIa</b> : Facteur VII activé
<b>ADP</b> : Adénosine di-phosphate	<b>fa/fa</b> : Rat Zucker obese
<b>ANRIL</b> : antisens non coding RNA in the INK4 locus	<b>FAK</b> : Focal adhesion kinase
<b>AMPc</b> : Adénosine mono-phosphate cyclique	<b>FA/-</b> : Rat Zucker non obèse
<b>AT</b> : Antithrombine	<b>FC</b> : Facteur de croissance
<b>AT-II</b> : Angiotensine II	<b>FeCl<sub>3</sub></b> : Chlorure ferrique
<b>ATP</b> : Adénosine tri-phosphate	<b>FGF</b> : Fibroblaste Growth Factor
<b>AVC</b> Accident vasculaire cérébrale	<b>FT</b> : Facteur tissulaire
<b>CD (41, 146)</b> : Cluster de différenciation	<b>G-CSF</b> : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
<b>CDK</b> : cyclin dependant kinase	<b>GM-CSF</b> : Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor
<b>CE</b> : Cellules endothéliales	<b>GMPc</b> : Guanosine mono-phosphate cyclique
<b>CMLVs</b> : Cellules musculaires lisses vasculaires	<b>Gp</b> : Glycoprotéine
<b>cRADPV</b> : Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val	<b>GTP</b> : Guanosine tri-phosphate
<b>cRGDPV</b> : Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val	<b>GWAS</b> : Genome Wide Association Study
<b>DAG</b> : Diacyglycérol	<b>HDL</b> : Lipoprotéine de haute densité
<b>DMSO</b> : Diméthylsulfoxyde	<b>HTA</b> : Hypertension artérielle
<b>ECA</b> : Enzyme de conversion à l'angiotensine	<b>IL</b> : Interleukine
<b>EGF</b> : Facteur de croissance épithélial	<b>ICAM-1</b> : Molécule 1 d'adhérence intercellulaire
<b>EPCR</b> : Récepteur endothélial de la protéine C	<b>ICAP-1</b> : Integrin Cytoplasmic domain Associated Protein-1
<b>ERK</b> : Kinase régulée par signal extracellulaire	<b>IEC</b> : inhibiteur de l'enzyme de conversion à l'angiotensine
<b>ET-1</b> : endothéline	<b>IP3</b> : Inositol triphosphate
<b>ETP</b> : Endogenous Thrombin Potential	<b>JNK</b> Kinase C-Jun N-terminal
<b>F1+2</b> : Fragments 1 + 2 de la prothrombine	<b>KCl</b> : Chlorure de potassium
<b>FII</b> : Prothrombine	<b>KLF</b> : Kruppel like factor
<b>FIIa</b> : Thrombine	<b>LDL</b> Lipoprotéine de faible densité
<b>FVa</b> : Facteur V activé	<b>MDGI</b> : mammary-derived growth inhibitor
<b>FXa</b> : Facteur X activé	<b>MCP-1</b> : Protéine chémoattractante 1 des monocytes
<b>FXIII</b> : Facteur XIII	
<b>FIX</b> : Facteur IX	

<b>MEC</b> : matrice extracellulaire	<b>TBS</b> : Tris Buffered Saline
<b>MMP</b> : Métalloprotéinase matricielle	<b>TBX</b> : Thromboxane synthase
<b>NaCl</b> : Chlorure de sodium	<b>TIMP</b> : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
<b>NF-<math>\kappa</math>b</b> : Nuclear factor-Kapp B	<b>TEP</b> : Tomographie par Emission de Positons
<b>NO</b> : Monoxyde d'azote	<b>TGF</b> : Transforming Growth Factor
<b>OCT</b> : Optimal Cutting Temperature	<b>TM</b> : Thrombomoduline
<b>PAI-1</b> Plasminogen activator inhibitor-1	<b>TNF-<math>\alpha</math></b> : Tumor necrosis factor-alpha (Facteur tumoral de nécrose $\alpha$ )
<b>PAF</b> : Platelet Activating Factor	<b>t-PA</b> : tissue Plasminogen activator (Activateur tissulaire du plasminogène)
<b>PAR-1 et -4</b> : Protease Activated Receptor	<b>TFPI</b> : Tissue factor pathway inhibitor (L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire)
<b>PBS</b> : Phosphate Buffered Saline	<b>TXA2</b> : Thromboxane A2
<b>PC</b> : Protéine C	<b>uPA</b> : Urokinase
<b>PCR1/2</b> : Polycomb Repressive complex 2	<b>SNP</b> : Single Nucleotide Polymorphism
<b>PDGF</b> : Platelet-derived growth factor	<b>SHR</b> : Spontaneously Hypertensive Rat
<b>PDP</b> : Plasma dépourvu en plaquettes	<b>SM-MHC</b> : Smooth muscle myosin heavy chain (chaîne lourde de la myosine du muscle lisse)
<b>PE</b> : Phosphatidyléthanolamine	<b>SRF</b> : Serum response factor (Facteur de réponse au sérum)
<b>PG</b> : Prostaglandine	<b>VCAM</b> : Vascular cell adhesion molecule
<b>PI</b> : Phosphatidylinositol	<b>VMP</b> : Volume plaquettaire moyen
<b>PIP2</b> : Phosphatidylinositol 4,5 bis-phosphate	<b>VEGF</b> : Vascular endothelial growth factor (Facteur de croissance endothéliale vasculaire)
<b>PL / PPL</b> : Phospholipide	<b>WVF</b> : von Willebrand Factor (Facteur de von Willebrand)
<b>PLC</b> Phospholipase C	<b>WKY</b> : rat Wistar Kyoto
<b>PPA</b> : Activité Phospholipides Procoagulantes	<b><math>\alpha</math>-SMA</b> : $\alpha$ -Smooth Muscle Actin
<b>PRP</b> : Plasma riche en plaquettes	
<b>PS</b> : Phosphatidylsérine	
<b>RGD</b> Arg-Gly-Asp	
<b>TAT</b> : Thrombine-Antithrombine	

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

L'hémostase est un ensemble de processus physiologiques qui permet de colmater une brèche dans un vaisseau sanguin suite à une lésion vasculaire (Versteeg et al., 2013). L'hémostase est composée de trois étapes interdépendantes : l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse. La première étape conduit à la formation d'un caillot constitué de plaquettes agrégées entre elles. La coagulation, cascade enzymatique qui mène à la génération de thrombine et à la formation d'un réseau de fibrine insoluble, permet de consolider le clou plaquettaire. L'étape de la fibrinolyse va résorber le clou fibrino-plaquettaire ce qui permet de rétablir une circulation sanguine normale (Furie and Furie, 2008; Versteeg et al., 2013).

### I. Génération de thrombine plasmatique et tissulaire

Avant d'expliquer en détail ce concept, il est nécessaire de souligner la différence entre la génération de thrombine *in vivo* et *in vitro*. La génération de thrombine *in vivo* s'évalue par la présence dans le sang de marqueurs de l'activité thrombinique tels que le fragment 1.2 de la prothrombine, les complexes thrombine-antithrombine (TAT) et les formes de fibrines dégradées comme les D-dimères. *In vitro*, la génération de thrombine est un test qui montre la « capacité » du sang (et notamment du plasma) à former de la thrombine. Ainsi, une personne normale avec une thrombose provoquée montrera des signes d'augmentation de thrombine *in vivo* tandis que sa capacité à former de la thrombine reste inchangée. Au contraire, un enfant avec un déficit d'anti-thrombine va avoir une génération de thrombine accrue *in vitro* sans signes de production de thrombine excessive *in vivo* (Hemker, 2015; Ten Cate and Hemker, 2016). Nous allons exposer, ici, les mécanismes généraux qui ont lieu au niveau du plasma et de la paroi.

#### 1) Génération de thrombine dans le compartiment plasmatique

La coagulation dans le compartiment plasmatique, dont l'étape clef est la génération de thrombine, fait intervenir des protéines plasmatiques mais nécessite également une surface phospholipidique, du calcium et des récepteurs pour lier et concentrer les facteurs de coagulation à la surface membranaire (Butenas and Mann, 2002). Cette cascade dynamique de réactions enzymatiques, qui comprend une phase d'initiation et une phase de génération explosive de thrombine, permet la transformation du fibrinogène soluble en un réseau de fibrine insoluble qui obstrue la brèche vasculaire et consolide le caillot.

La coagulation se définit par un équilibre entre des facteurs de la coagulation pro-coagulants et des facteurs anti-coagulants. Excepté le facteur tissulaire (FT), ces proenzymes inactives sont tous des glycoprotéines synthétisés dans le foie. La notion de facteurs de la coagulation activés est indiquée par un chiffre romain suivi du suffixe -a- [facteur II (non activé) en facteur IIa (activé)] (Wright, 1958).

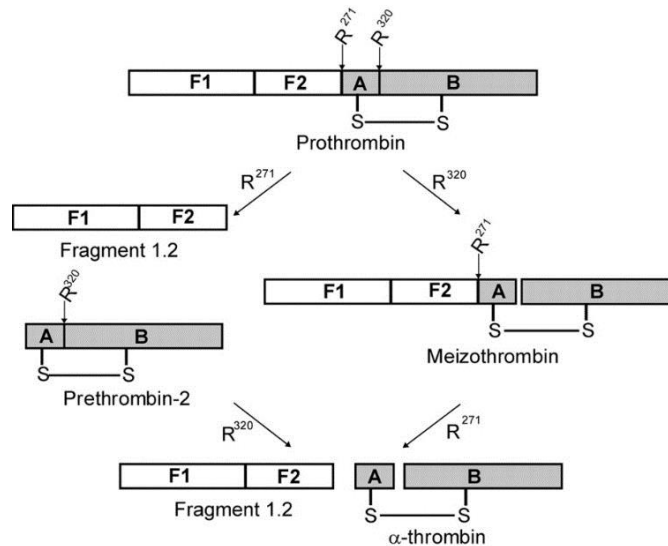
La coagulation se décompose en trois phases qui sont : l'initiation, l'amplification/propagation et l'inhibition (Mano et al., 1999; Monroe and Hoffman, 2002). La cascade enzymatique se déroule à la surface des cellules qui exposent des phospholipides chargés négativement (notamment la phosphatidylsérine (PS)) et mène à la polymérisation du fibrinogène circulant en fibrine insoluble.

- *Initiation ou voie extrinsèque de la coagulation :*

Lors d'une brèche vasculaire, les CMLVs et les fibroblastes sont exposés au flux sanguin. Ces cellules synthétisent de façon constitutive un initiateur majeur de la cascade de la coagulation : le facteur tissulaire (FT). Ce FT est, en temps normal, isolé du compartiment sanguin par l'endothélium. Le FT peut être synthétisé de manière inductible en réponse à des cytokines proinflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, protéine C réactive) par les monocytes ou les cellules endothéliales (CE) (Edwards et al., 1979; Taubman et al., 1993).

La coagulation est alors déclenchée par l'interaction entre le FT et le FVIIa. Ce dernier est présent de manière basale dans la circulation et représente 1 à 2 % du FVII total (Morrissey et al., 1993). Le complexe FT/FVIIa possède alors une activité protéolytique qui peut être inhibé par le Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). Ce complexe va activer les facteurs IX et X. Le FXa active la prothrombine à la surface des plaquettes activées par exemple provoquant la formation de thrombine (Versteeg et al., 2013) .

L'une des fonctions physiologiques la plus importante dans l'hémostase et la thrombose est la quantité de thrombine que le sang peut fournir au site de liaison. La thrombine, également nommée facteur IIa est formée de deux chaînes : une légère de 36 acides aminés et une lourde de 259 acides aminés. C'est une sérine-protéase, engendrée par protéolyse de la prothrombine lors de la lésion de la paroi vasculaire (**Figure 1**).



**Figure 1 : Schéma de l'activation de la prothrombine en thrombine.** La prothrombine humaine possède un fragment 1 (F1), un fragment 2 (F2) et des chaînes  $\alpha$ -thrombine A et B. La prothrombine est activée en  $\alpha$ -thrombine par clivage de l'arginine Arg271 (R271) et Arg320 (R320). Le premier clivage sur Arg271 (panel de gauche) génère un fragment 1.2 et un intermédiaire inactif qui est la préthrombine-2. Le clivage au niveau de l'Arg320 génère l' $\alpha$ -thrombine. L'intermédiaire actif, la méizothrombine, est produit quand le clivage initial se passe sur l'Arg320 (panel de droite). Enfin, le clivage sur l'Arg271 produit un fragment 1.2 et de l' $\alpha$ -thrombine (Wood et al., 2011).

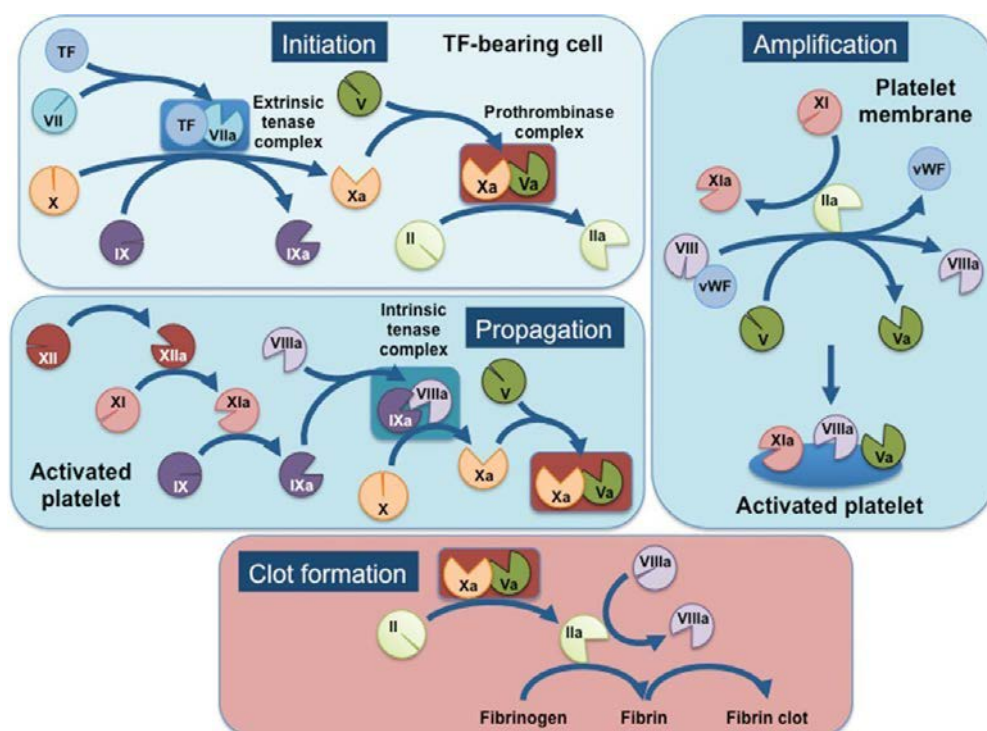
Cette thrombine présente de multiples fonctions. Elle régule les réactions pro- et anticoagulants en interagissant avec d'autres protéines et des récepteurs cellulaires (Borisssoff et al., 2009). Elle agit également sur de nombreux processus comme l'angiogenèse, l'inflammation et la prolifération cellulaire (Spronk et al., 2013). La thrombine est produite en quantité importante par les plaquettes et joue un rôle dans la cascade de la coagulation sanguine dans laquelle elle transforme le fibrinogène insoluble en fibrine soluble (Monroe et al., 2002). A l'inverse, la thrombine dite « tissulaire » est produite en plus faible quantité dans les tissus. En se fixant à ses récepteurs, elle va jouer un rôle dans la coagulation, la cicatrisation et la barrière endothéliale. La thrombine peut activer un grand nombre d'effecteurs intracellulaires par l'intermédiaire des protéines liant la guanine triphosphate (GTP).

#### *Amplification/propagation :*

L'amplification et la propagation de la coagulation débutent dès les premières traces de thrombine formées. La thrombine formée active les plaquettes en se fixant aux récepteurs activés PAR-1 et -4 (Protease Activated Receptor), augmentant ainsi les phospholipides (PL) membranaires des plaquettes disponibles pour la coagulation. L'inhibition de la flippase et l'activation de la scramblase va permettre

l'externalisation des phospholipides anioniques (Bever et al., 1991). La thrombine va également activer les facteurs VIII, V et XI qui sont des cofacteurs dépourvus d'activité enzymatique propre mais capables d'augmenter la vitesse d'activation des enzymes (**Figure 2**). Ces cofacteurs engendrent la formation de complexes ténase (FIXa-FVIIIa-Ca<sup>2+</sup>-phospholipides) et prothrombinase (FXa-FVa-Ca<sup>2+</sup>-phospholipides) qui vont permettre une activation rapide et massive de la prothrombine (Saenko et al., 1999).

La thrombine va alors cliver le fibrinogène à deux endroits différents, ce qui va donner des monomères qui vont se polymériser pour former un caillot de fibrine. Cette fibrine est un cofacteur de la thrombine pour activer également le FXIII qui va stabiliser le caillot formé. (Bagoly et al., 2012).



**Figure 2 : Présentation schématique de la cascade de la coagulation sanguine.** Le modèle est divisé en 4 phases : l'initiation, la propagation, l'amplification et la formation du caillot. (Spronk et al., 2014)

- *Inhibition :*

Deux systèmes principaux permettent de limiter la cascade de la coagulation : les inhibiteurs circulants dits « stœchiométriques » et le système de la protéine C (PC).

Parmi les inhibiteurs stœchiométriques l'antithrombine (AT) est le principal acteur de cette inhibition. L'AT va piéger la thrombine et le FXa en les fixant par une liaison covalente irréversible mais elle a aussi la capacité d'inhiber tous les facteurs de la coagulation activés. Les complexes vont être éliminés par le foie (Beeler et al., 1979; Seegers et al., 1954).



Un autre inhibiteur stœchiométrique joue un rôle dans ce processus : le TFPI. C'est un inhibiteur lent et compétitif qui forme des liaisons faibles. Il va lier le FXa avec le FT et le FVIIa formant le complexe (FT/FVIIa/FXa/TFPI) qui inhibe l'activation du FX et du FIX. Le complexe FT/FVIIa n'est inhibé que lorsque le FX est activé. En zones saines (vaisseaux non lésés), le TFPI joue un rôle dans l'inhibition basale de la coagulation en empêchant la phase d'amplification/propagation.

Le système de la PC est un système d'inhibition qui est dynamique. Il devient actif en réponse à une activation par la thrombine. Quand la thrombine est liée à la thrombomoduline (TM) à la surface des cellules, l'activation devient nettement plus efficace. L'activation de la Protéine (PC) en PCa est plus rapide et efficace si la PC est fixée au complexe EPCR / thrombine/TM (Taylor et al., 2001). De plus, la thrombine liée la TM ne peut exercer ses effets procoagulants.

### 2) Génération de thrombine dans le compartiment pariétale

Des résultats récents *in vitro* suggèrent que la paroi artérielle est également capable de générer de la thrombine. La présence de fibrine au sein de la plaque d'athérosclérose est un argument en sa faveur. Cette réponse est appelée « thrombine tissulaire » par opposition à la « thrombine plasmatique ».

Elle met en jeu des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) (définition dans le paragraphe II de la synthèse bibliographique) capables de servir de support cellulaire pour générer la thrombine en fonction des conditions hémodynamiques ou inflammatoires de la paroi artérielle. En cas de brèche, l'exposition du collagène et des CMLVs présents au niveau du sous-endothélium favorisent l'activation et l'agrégation plaquettaire pour aboutir à des thrombi plaquettaires et fibrino-cruoriques plus stables (Badimon et al., 2012). De surcroît, les CMVLs se trouvent alors au contact du sang et pourraient être directement impliquées dans l'hémostase.

La synthèse de molécules procoagulantes par les CMLVs suggère également que ces cellules pourraient de façon autonome générer de la thrombine au niveau pariétal. Cette thrombine est susceptible d'exercer des effets cellulaires ou des effets coagulants au sein de la paroi.

La thrombine a des effets sur plusieurs fonctions biologiques des cellules constituant la paroi vasculaire, comme la prolifération, la différenciation, la migration des CMLVs ou des CE, la réponse inflammatoire, la production de la matrice extracellulaire (MEC), le développement vasculaire, l'athérogénèse et l'angiogénèse. Vu et coll ont découvert le premier récepteur de la thrombine, appartenant à la famille des récepteurs PARs, le récepteur 1 activé par les protéases (PAR-1) (Vu et al., 1991).

Les CMLVs sont le composant principal de la média et sont responsable du tonus contractile et de la production de matrice extracellulaire. Ces cellules sont également constamment exposées aux contraintes mécaniques de pression mais également aux contraintes de cisaillement (flux sanguin). Ces contraintes cycliques, rythmées par la fréquence cardiaque, régulent de nombreuses fonctions cellulaires *via* les intégrines. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est non seulement un mécano-transducteur mais aussi le récepteur de la prothrombine à la surface des CMLVs. L'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  par les contraintes mécaniques cycliques, favorise l'adhésion des CMLVs à la prothrombine et ainsi accélère la génération de thrombine à la surface de ces cellules (Mao et al., 2012b). L'endothélium qui tapisse la paroi vasculaire, assure une fonction de barrière entre le compartiment sanguin et les CMLVs et exerce des propriétés anticoagulantes. En raison de la conductance radiale hydraulique, la paroi artérielle est constamment soumise à la convection de molécules circulantes plasmatiques (Michel et al., 2007). Par ce processus, les facteurs de coagulation pourraient se retrouver en contact direct avec les CMLVs en absence de brèche vasculaire. Cette convection physiologique des peptides ou des macromolécules du plasma vers la paroi est la principale source de stimuli extrinsèques, qui, avec le temps, modifie le phénotype des CMLVs (surcharge lipidique, hyperglycémie ou influence de zymogènes tels que les facteurs de coagulation). En réponse à des changements de gradients de convection liés à différentes situations physiologiques comme le vieillissement ou pathologiques comme l'hypertension, l'athérosclérose ou les anévrismes de l'aorte, les CMLVs peuvent modifier leur phénotype par des voies de signalisation ligand / récepteur.

### 3) La fibrinolyse

La fibrinolyse est le processus final de l'hémostase qui fait suite à la génération de thrombine et qui va permettre de lyser le caillot formé par la fibrine et les plaquettes. La fibrine est dégradée en différents fragments. Les produits de dégradation de la fibrine vont alors être dégradés par d'autres protéases ou vont être directement évacués par les reins ou le foie.

L'enzyme principale de ce processus est la plasmine (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005). Le plasminogène est transformé en plasmine par deux enzymes qui sont constituées de deux chaînes peptidiques, le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) et l'uPA (urokinase). Ces deux activateurs, t-PA et uPA, sont sécrétés et synthétisés sous une forme inactive constituée d'une seule chaîne peptidique. La plasmine va permettre de les activer par coupure protéolytique. Le t-PA est une sérine protéase qui est synthétisée par les CEs ainsi que par les cellules dérivées de la lignée hématopoïétique. L'uPA, est synthétisé sous une forme inactive avant d'être activé par clivage protéolytique après fixation à son récepteur (uPAR). Ce système est régulé par les deux formes du PAI (inhibiteur de

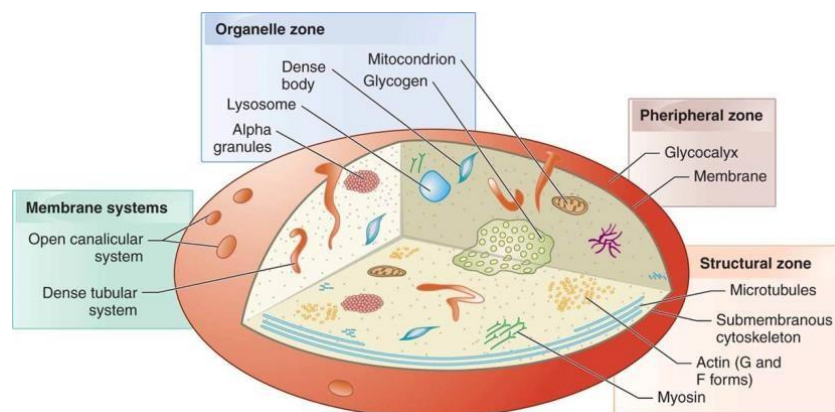
l'activateur du plasminogène) qui sont PAI-1 et PAI-2 et qui sont toutes deux des inhibiteurs de sérines protéases.

## II. Les cellules : support de la génération de thrombine

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

### 1) Les plaquettes

Les plaquettes, ou thrombocytes, sont des fragments anucléés issus des mégacaryocytes formés dans la moelle osseuse et libérés dans le système vasculaire au niveau des sinusoiïdes. Ces cellules contiennent des filaments d'actine, des microtubules, des grains de glycogène, des mitochondries, des granules alpha, des granules denses et des lysosomes (**Figure 3**). Les plaquettes circulent à l'état non activé sous forme discoïde, avec un diamètre d'environ 2  $\mu\text{m}$  et un volume de 7 à 12  $\mu\text{m}^3$  chez l'homme (Xu et al., 2016) et de 5  $\mu\text{m}^3$  chez la souris.



**Figure 3 : Ultrastructure plaquettaire.** Principales caractéristiques observées dans une plaquette discoïde au repos. (Modifié de (Thompson, 1983)).

Les 2/3 des plaquettes circulent dans le sang (150 000 à 400 000 plaquettes/ $\mu\text{L}$ ) tandis que le tiers restant est séquestré dans la rate (Boneu, 1997). La durée de vie des plaquettes est de 8 à 10 jours chez l'homme et de 3 à 4 jours chez la souris. Elles sont éliminées par phagocytose au niveau de la rate, du foie, et de la moelle osseuse par les monocytes et les macrophages. Les plaquettes les plus âgées

sont principalement phagocytées par les macrophages de la rate et du foie (Tsakiris et al., 1999; White, 1987).

### a) L'activation plaquettaire en réponse à une brèche vasculaire

L'endothélium sain n'interagit pas avec les plaquettes dû fait de ses propriétés anti-thrombotiques. Au niveau de l'intima sain, les plaquettes libèrent de l'ATP (Adénosine-tri-phosphate), de l'ADP (Adénosine-di-phosphate) et de la sérotonine qui en s'associant avec la thrombine induit la synthèse endothéliale de substances anti-agrégantes et anti-adhérentes telles que le monoxyde d'azote (NO), la prostaglandine (PGI<sub>2</sub>) et le platelet-activating factor (PAF). Le NO va entraîner la relaxation des CMLVs qui dilatent le vaisseau et élimine les micro-agrégats (Dingemans et al., 2000; Pearson, 1999; Tsakiris et al., 1999; White, 1987). Les CE synthétisent également la thrombomoduline (TM) qui, en se liant à la thrombine, diminue l'effet coagulant de cette dernière. Ces cellules génèrent, en plus, un inhibiteur du facteur tissulaire (FT). Les propriétés anti-thrombotiques des CE sont dues également à la composition et à l'arrangement des phospholipides et des glycoprotéines de la membrane qui ne permettent pas l'interaction avec les plaquettes (une face apicale anticoagulante (ou thromborésistante) et une face basale qui adhère fortement aux molécules thrombogènes du sous-endothélium).

En cas d'altération de l'endothélium, le rôle protecteur des CE est localement perdu. Les plaquettes vont interagir avec les éléments thrombogènes du sous-endothélium (collagène, vWF, FT). Le processus d'activation des plaquettes comprend plusieurs étapes : le changement de forme, l'agrégation, la sécrétion et la microvésiculation qui conduisent entre autres à l'expression de phospholipides procoagulants à la surface des membranes (Boos et al., 2006; Solum, 1999; Xu et al., 2016).

### b) L'adhérence et le changement de forme

L'adhérence des plaquettes au sous-endothélium fait intervenir de nombreuses molécules telles que le facteur de von Willebrand (vWF) des CE ou encore la glycoprotéine (Gp) Ib qui forment un complexe avec les glycoprotéines IX et V (complexe GpIb-V-IX) au niveau des plaquettes.

Le vWF, synthétisé par les mégacaryocytes et les CE, peut être soit secrété de manière constitutive, soit stocké dans les corps de Weibel Palade jusqu'à sa sécrétion par un stimulus (Bryckaert et al., 2015).

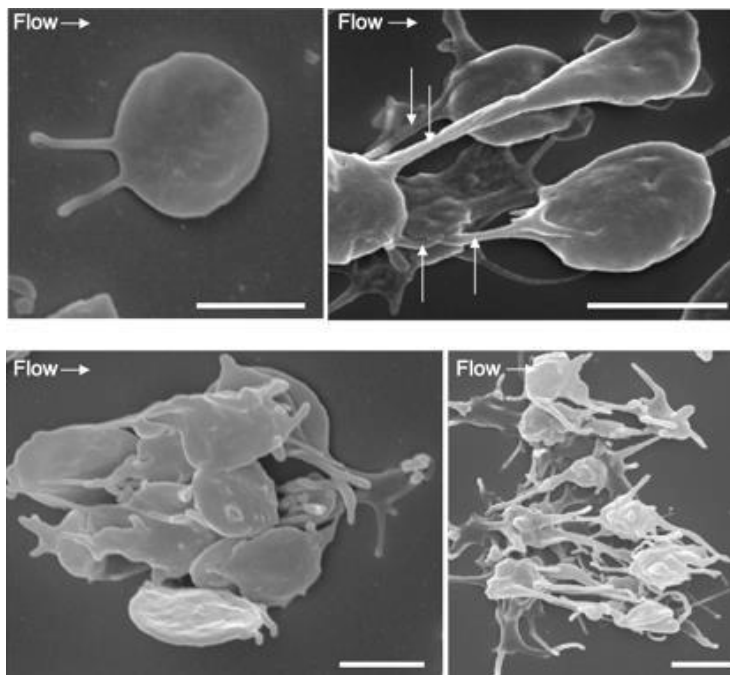
Au niveau des plaquettes, le vWF est stocké dans les granules  $\alpha$ . Il est secrété suite à l'activation des plaquettes (Sporn et al., 1986). Si les plaquettes ne sont pas activées, la forme plasmatique du vWF ne permet pas l'adhérence (Ruggeri and Ware, 1993). En cas de brèche vasculaire, le vWF se fixe au collagène du sous-endothélium ce qui provoque un changement de sa conformation et lui permet

d'interagir avec le complexe GpIb-V-IX formé à la surface des plaquettes (Andrews et al., 1997; Bryckaert et al., 2015).

Quatre glycoprotéines forment le complexe GpIb-IX-V. Ce dernier est présent dans la membrane plaquettaire et possède des domaines riches en leucine. GpIb $\alpha$  et GpIb $\beta$  sont liées par un pont disulfure et associées de façon non covalente avec GpIX et GpV (Bryckaert et al., 2015).

La fixation du vWF au complexe GpIb-V-IX aboutit à une élévation du calcium cytoplasmique. Il y a un réarrangement du cytosquelette qui entraîne la dégranulation. Le complexe vWF/GpIb-V-IX provoque l'activation d'une phospholipase qui va générer deux messagers, l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) par hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 bis-phosphate (PIP2). L'IP3 formé va mobiliser le calcium cytoplasmique tandis que le DAG active la PKC et induit le réarrangement du cytosquelette d'actine.

Au repos les plaquettes sont discoïdes mais l'activation provoque la dépolymérisation des microtubules et une polymérisation des filaments d'actine ce qui va aboutir à un changement de forme de la plaquette qui devient sphérique et émet des pseudopodes (**Figure 4**).



**Figure 4 : Adhérence des plaquettes à la membrane sous flux.** (A gauche et en haut) Adhérence d'une plaquette sous forme discoïde (microscopie électronique à balayage) qui commence à former des pseudopodes en se liant au vWF sous une force de cisaillement de  $1800s^{-1}$ . (A droite et en haut) Formation de longs prolongements cytoplasmiques entre les plaquettes (flèches). (A gauche et en bas

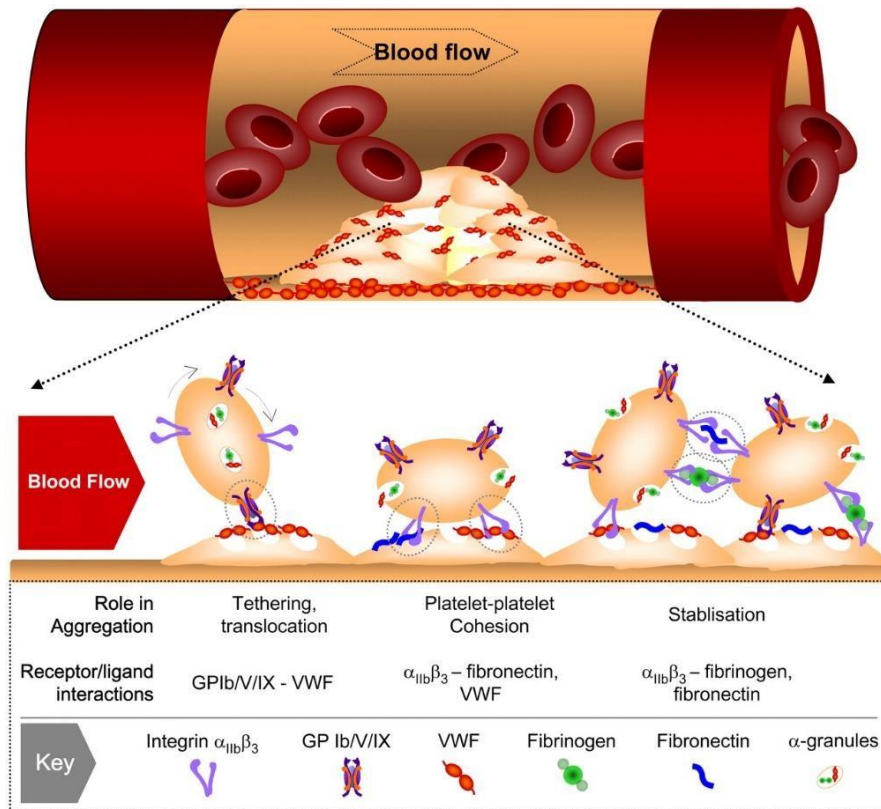
Agrégation réversible des plaquettes. Notez que, dans cette image, toutes les plaquettes se regroupent autour d'un noyau central de plaquettes activées et développent de longs filopodes. (A droite et en bas) Le développement d'agrégats stables de plaquettes est associé à un changement de forme plaquettaire caractérisée par une forme sphérique et non discoïde avec l'extension de nombreux filopodes (Jackson, 2007).

Quand la plaquette est activée, les membranes des granules fusionnent avec celles du système canaliculaire ouvert. C'est ainsi que les molécules thrombogènes sécrétées telles que l'ADP, la sérotonine, la thrombospondine, le fibrinogène et le vWF vont participer au recrutement des plaquettes non activées et initier l'agrégation (Blockmans et al., 1995).

### c) L'agrégation plaquettaire

Le complexe calcium dépendant GpIIb/IIIa ou  $\alpha_{IIb}\beta_3$  joue un rôle central dans l'agrégation plaquettaire. Il se lie à des séquences RDG (Arginine- Glycine-Asparagine) présentes au niveau de protéines telles que le fibrinogène, le vWF, la prothrombine, la fibronectine ou encore la vitronectine (**Figure 5**). Cet hétérodimère GpIIb/IIIa est constitué de deux glycoprotéines : IIb et IIIa. La GpIIb est composée d'une chaîne lourde extracellulaire ( $\alpha$ ) et d'une chaîne légère transmembranaire ( $\beta$ ) reliées entre elles par un pont disulfure. La GpIIIa est constituée d'une chaîne polypeptidique unique, comportant plusieurs ponts disulfures.

Chaque plaquette possède à peu près 50 000 complexes GpIIb/IIIa à sa surface et ce nombre croît avec l'activation plaquettaire et la libération du contenu des granules  $\alpha$ . Suite à une protéolyse de la partie extracellulaire de la sous-unité IIb, le complexe est activé. Cette activation provoque un changement de forme et permet au complexe de lier des protéines comme le fibrinogène, le vWF, ou la vitronectine. Le fibrinogène, qui possède 3 paires de sites de liaison pour la GpIIb/IIIa, va lier les plaquettes entre elles et favoriser ainsi l'agrégation (Bryckaert et al., 2015; Xu et al., 2016).



**Figure 5 : Implication des interactions récepteur-ligand dans l'agrégation plaquettaire sous un flux de cisaillement élevé.** Dans des conditions de flux sanguin rapide (généralement des taux de cisaillement supérieurs à  $1\ 000\ s^{-1}$ ), l'adhérence des plaquettes à la surface de plaquettes immobilisées implique une interaction vWF-GPIb. Cette interaction est réversible. Pour des taux de cisaillements atteignant  $10\ 000\ s^{-1}$ , l'adhésion plaquette-plaquette n'est pas maintenue, ce qui entraîne le déplacement des plaquettes (par translocation) à travers la surface du thrombus. La stimulation des plaquettes par un ou plusieurs agonistes solubles au cours de la translocation favorise la liaison du vWF et de la fibronectine à l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  qui conduit à l'adhérence des plaquettes entre elles. A des taux de cisaillements élevés, le rôle principal du complexe formé par l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  à la fibrine (fibrinogène) est de stabiliser les agrégats formés (Jackson, 2007).

#### d) La sécrétion

La sécrétion des trois types de granules peut avoir lieu selon deux mécanismes différents qui fait suite à l'adhérence et à la contraction des plaquettes. L'agrégation et la sécrétion (ADP, calcium, fibrinogène et sérotonine) sont renforcées par la libération de ces molécules qui interviennent dans la cascade de coagulation (FV, fibrinogène, vWF, PS) et modifient la perméabilité vasculaire (VEGF) et le tonus vasculaire (sérotonine). La sécrétion impliquant la voie de l'acide arachidonique (AA) est observée dès la présence de faibles concentrations d'agoniste.

Deux voies permettent de générer de l'AA à partir des phospholipides membranaires. La première voie se fait à partir du phosphatidylinositol (PI) par action de la phospholipase C (PLC) et de la diglycérique lipase. La seconde voie se réalise à partir de la phosphatidylcholine (PC) ou de la phosphatidyléthanolamine (PE) par action de la phospholipase A2. La cyclooxygénase transforme une partie de l'AA libéré en prostaglandine endoperoxydes (PG) G2 et H2. La PGH2 sous l'effet de la thromboxane synthase (TBX) génère du TBXA2 qui est vasoconstricteur et inducteur de l'agrégation plaquettaire. Ce dernier inhibe la production d'AMPc (Adenosine mono-phosphate cyclique) intraplaquettaire et la libération de calcium.

Si les concentrations en agonistes sont fortes alors un mécanisme indépendant de la voie de l'AA va déclencher la sécrétion plaquettaire. Cette voie fait intervenir des protéines G couplées aux récepteurs des agonistes, la protéine G<sub>p</sub> qui active la PLC et la protéine G<sub>i</sub> qui inhibe l'activité de l'adénylate cyclase et diminue le taux d'AMPc. L'activation de la PLC et l'hydrolyse du PIP2 va générer deux messagers : l'IP3 et le DAG. L'IP3 produit mobilise le calcium cytoplasmique et le DAG active la PKC ce qui va favoriser la sécrétion et l'agrégation (Broos et al., 2012; Sporn et al., 1986).

### e) La microvésiculation

La dernière étape de l'activation plaquettaire correspond à l'externalisation de phospholipides anioniques procoagulants (PS majoritairement) appelée également « flip-flop » membranaire qui servent de sites d'assemblage aux complexes de la coagulation (tenase, prothrombinase). Les microparticules sont observées à la périphérie des agrégats plaquettaires. Elles expriment l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  et la sélectine P dont la présence témoigne d'une activation plaquettaire et elles apportent des surfaces catalytiques nécessaires à l'activation des facteurs de la coagulation.

La microvésiculation dépend de trois points qui sont la distribution des phospholipides membranaires régulée par des enzymes calcium-dépendantes, le réarrangement du cytosquelette d'actine sous-membranaire et de protéases calcium-dépendantes.

Ainsi, la redistribution des phospholipides résulte d'un influx de calcium dans le cytoplasme qui va activer une *phospholipid scramblase* calcium-dépendante. Cette enzyme va catalyser la permutation des phospholipides entre les deux feuillettes (flip-flop). Elle va inhiber dans le même temps l'*aminophospholipid translocase* qui a pour rôle de transporter les phosphatidylsérine (PS) et les phosphatidyléthanolamine (PE) du feuillet externe vers le feuillet interne (Zwaal and Schroit, 1997).

La microvésiculation dépend également d'un réarrangement du cytosquelette d'actine (Fox et al., 1990). La rupture des points d'ancrage entre les protéines membranaires et du cytosquelette peuvent conduire à la microvésiculation ainsi que le processus de fusion des membranes qui vient après le bourgeonnement (Knowles et al., 1997; Vemuri et al., 1996).



La microvésiculation dépend également des activités protéasiques comme la calpaine qui est une cystéine protéinase ubiquitaire dépendante du calcium. Lorsque les plaquettes sont stimulées à la thrombine, la calpaine est recrutée autour des foyers d'adhésion autour de l'intégrine  $\alpha_{11b}\beta_3$ . Elle est également activée pendant l'adhésion des plaquettes au vWF *via* GpIb $\alpha$ -IX-V et  $\alpha_{11b}\beta_3$ . Elle est impliquée dans la relaxation du caillot de fibrine par l'hydrolyse des protéines des foyers d'adhésion connectés au réseau de fibrine (Schoenwaelder et al., 1997).

Ces microvésicules exprimant à leur surface des PL procoagulants peuvent être impliquées dans la coagulation et notamment avec un rôle dans les pathologies (Siljander, 2011; Viera et al., 2012).

## 2) La média : les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs)

### a) Caractérisation des CMLVs

La média, couche intermédiaire de la paroi vasculaire, est constituée de CMLVs. Ces cellules, contrairement aux cellules des muscles striés, sont uninuclées et leur contraction est régulée par le système nerveux autonome ainsi que par la production intrinsèque de NO par les CE (Husain and Moss, 1988). Elles sont responsables de la régulation du diamètre des vaisseaux. Les CMLVs des artères saines sont quiescentes avec un haut degré de différenciation. Les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) synthétisées par les CMLVs forment des fibres élastiques qui procurent à l'artère des propriétés mécaniques (Lacolley et al., 2012). En effet, deux protéines matricielles sont majoritairement responsables de l'élasticité et de la résistance du tissu : l'élastine et le collagène. Les fibres élastiques sont constituées d'élastine et de protéines associées. La quantité dépend de l'artère et de sa distance par rapport au cœur. D'autres composants sont rencontrés dans la MEC comme le collagène I et III qui donnent la résistance aux vaisseaux sanguins. Dans l'adventice (couche externe entourant le vaisseau), le collagène est synthétisé et sécrété par les fibroblastes (Bou-Gharios et al., 2004).

Dans l'artère normale, les CMLVs fusiformes sont caractérisées par l'expression de protéines contractiles spécifiques telles que l' $\alpha$ -SMA, la h-caldesmone, la smootheline, la « smooth muscle myosin heavy chain » (SM-MHC) ou la métavinculine (Birukov et al., 1993; Huber, 1997; Kemp et al., 1991; Morgan and Gangopadhyay, 2001; Owens, 1998; Owens et al., 2004; Owens and Wise, 1997; Roy et al., 2001). Or, ces protéines sont des marqueurs de différenciation cellulaire et non pas des marqueurs de la lignée cellulaire qui permettent de différencier les CMLVs des autres types de cellules. L' $\alpha$ -SMA est largement exprimée dans les CMLVs (jusqu'à 40% des protéines des CMLVs) et joue un rôle dans la contraction de ces cellules. Néanmoins, cette protéine s'exprime également de façon

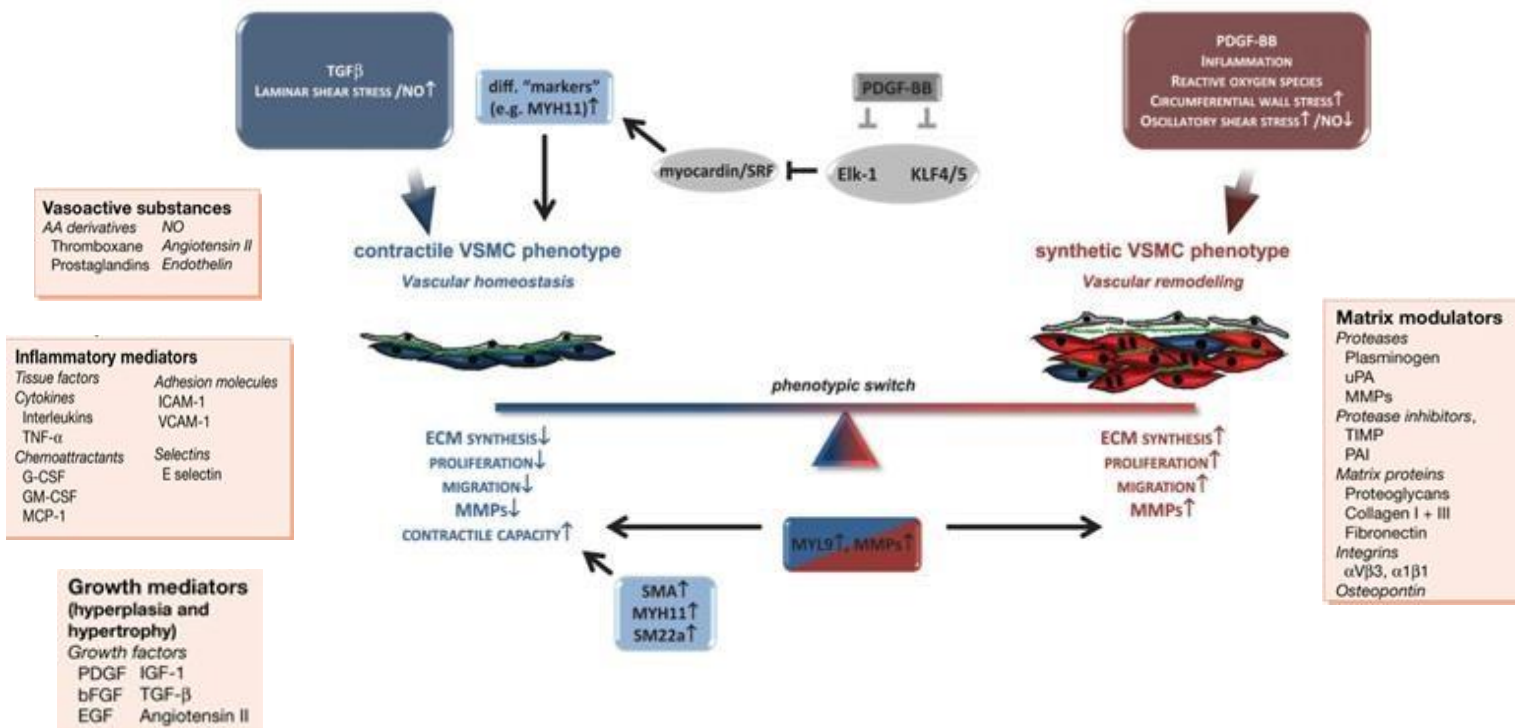
transitoire dans les cardiomyocytes (Woodcock-Mitchell et al., 1988), les CE (Arciniegas et al., 1992), les fibroblastes (Sartore et al., 2001) ou les cellules tumorales (Cintorino et al., 1986). Ainsi, l'identification de la lignée des CMLVs nécessite de baser l'étude sur de multiples marqueurs.

### b) Origine des CMLVs

L'origine embryologique des CMLVs serait, pour certaines, ectodermique (Etchevers et al., 2001) tandis que d'autres proviendraient du mésoderme (Majesky, 2007); Warteson *et al.*, 2008). Durant ce processus, de nombreux autres précurseurs ont été identifiés (Pfaltzgraff and Bader, 2015). Ainsi, certaines CMLVs proviendraient de la dédifférenciation des CE après la perte d'expression du vWF et de l' $\alpha$ -SMA (Arciniegas et al., 1992) ou encore de cellules souches pluripotentes d'origine médullaire (Kumar et al., 2014).

### c) Modulation phénotypique

Les CMLVs sont capables de passer d'un phénotype contractile à un phénotype prolifératif, synthétique et inflammatoire en réponse à différents stimuli (médiateurs inflammatoires, facteurs de croissance, ou encore aux interactions cellule-MEC) (Alexander et al., 2012; Mano et al., 1999; Owens et al., 2004). Le phénotype « contractile » exprime des protéines du cytosquelette comme la vimentine, le gelsoline, la vinculine, l' $\alpha$ -SMA ou encore la SM-MHC. Le phénotype « synthétique », quant à lui, est caractérisé par une plus grande prolifération, migration et une synthèse accrue de MEC et une perte de la plupart des marqueurs de différenciation présents dans le premier phénotype. Chacun des phénotypes des CMLVs est caractérisé par l'expression de marqueurs spécifiques (**Figure 6**).



**Figure 6 : Le phénotype contractile ou synthétique des CMLVs.** Les facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation et la modulation phénotypique des CMLVs. Le PDGF-BB inhibe l'activité du *serum response factor* (SRF) et la myocardine via l'inhibition de l'ETS containing protein-1 (Elk-1) et du Krüppel-like factor (KLF) ce qui maintient les CMLVs dans un phénotype « contractile ». AA, arachidonic acid; TNF, tumor necrosis factor; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte–monocyte colony-stimulating factor; MCP, monocyte chemoattractant protein; ICAM, intracellular adhesion molecule; VCAM, vascular cell adhesion molecule; PDGF, platelet-derived growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; EGF, epidermal growth factor; IGF, insulin-like growth factor; TGF, transforming growth factor; uPA, urokinase-type plasminogen activator; MMPs, matrix metalloproteinases; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; PAI, plasminogen activator inhibitor (Adapté de (Dzau et al., 2002; Korff et al., 2013)).

Les CMLVs pathologiques changent de morphologie (elles sont plus grandes que les cellules quiescentes) et augmentent la production de composants de la matrice extracellulaire comme le collagène III, la fibronectine, les métalloprotéinases, l'ostéopontine et la tropomyosine-4 (Abouhamed et al., 2003; Giachelli et al., 1995). Elles se caractérisent également par une augmentation du taux de prolifération, de migration et une diminution de l'expression de marqueurs contractiles spécifiques (Boehm and Nabel, 2001; Kemp et al., 1991; Polisenio et al., 2006). De plus, Schreier et coll, ont montré que l'activation du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) des CMLVs par ses ligands (thrombine, vasopressine, endothélin-1, phényléphrine, vasopressine ou ATP (Adenosine tri phosphate)) promeut

la prolifération et la migration des cellules et augmente l'expression de marqueurs de gènes proinflammatoires (Boehm and Nabel, 2001; Kemp et al., 1991; Poliseno et al., 2006; Schreier et al., 2016). La thrombine, en se fixant sur le récepteur EGFR, va induire la voie de signalisation ERK 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) qui va impliquer MMP-2 qui stimule la prolifération des CMLVs (Smiljanic et al., 2014).

Ces caractéristiques jouent un rôle dans la réparation vasculaire mais elles peuvent néanmoins mener au développement des pathologies vasculaires comme l'hypertension, l'athérosclérose et la formation néointimal. Plusieurs études ont montré que les changements phénotypiques des CMLVs interviennent durant le développement des pathologies cardiovasculaires.

### d) Mécanismes de régulation des CMLVs

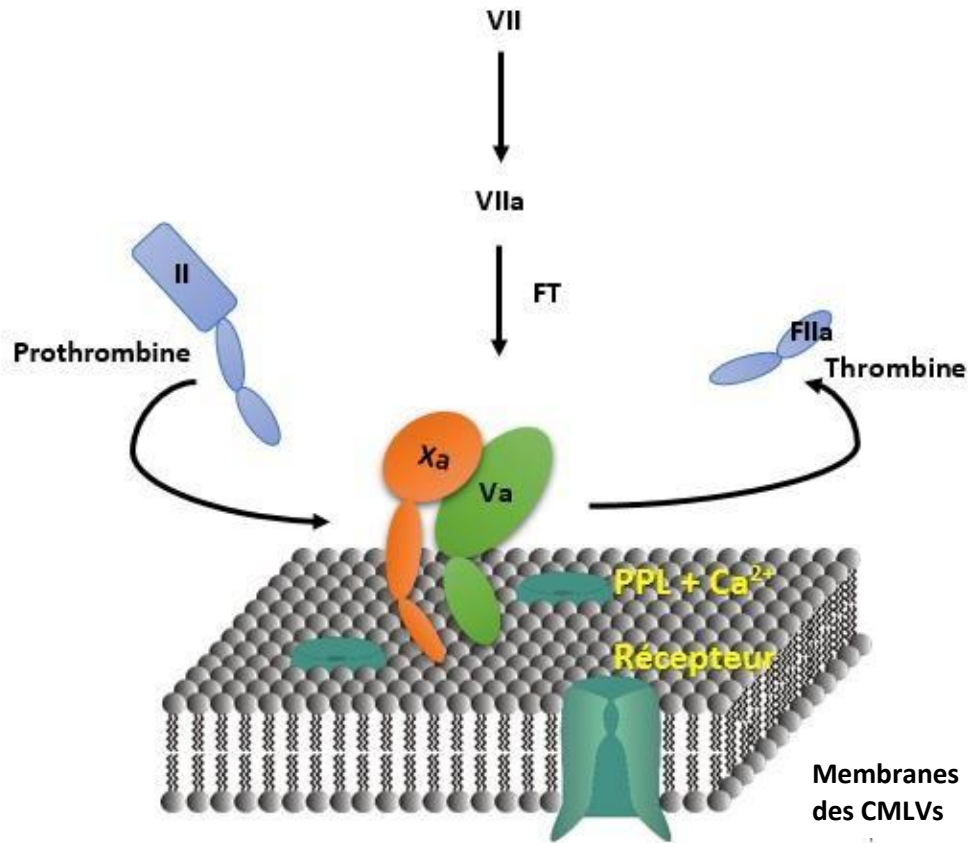
La régulation des différentes fonctions des CMLVs se fait par l'intermédiaire de nombreux signaux. Les CE vont sécréter de l'ET-1 (endothéline), des prostacyclines et du NO en réponse à la contrainte mécanique (Vozzi et al., 2014) qui va conduire à une adaptation du tonus vasculaire. En effet, les CMLVs de la paroi vasculaire sont soumises aux forces de distension par la pression intra-luminale. Une pression artérielle élevée induit une dilatation de la paroi vasculaire qui se caractérise par une hypertrophie des CMLVs et le maintien du phénotype contractile (Hellstrand and Albinsson, 2005).

Les CE, la MEC (Carey, 1991), les facteurs de croissance (FC) (Dinbergs et al., 1996), les MMPs (Auge et al., 2004), les facteurs neuronaux (Chamley et al., 1974), les formes réactives de l'oxygène ou encore la thrombine (Owens et al., 1996) contribuent à la régulation des CMLVs (Hirschi et al., 1999). Parmi les facteurs solubles, on retrouve essentiellement le PDGF (isoforme BB-PDGF) qui induit la prolifération et la migration des CMLVs ainsi que le TGF $\beta$  qui inhibe la prolifération des CMLVs.

### e) CMLVs et génération de thrombine

Les cellules de la paroi et le système de la coagulation collaborent étroitement pour réguler l'homéostasie vasculaire. Les pathologies pro-thrombotiques impliquent la génération de thrombine, qui active les plaquettes et catalyse la formation de la fibrine. La génération de thrombine à la surface des plaquettes est le modèle le plus courant. Or, cette génération de thrombine est également observée dans des systèmes utilisant d'autres composantes cellulaires comme les macrophages, les CE ou encore les CMLVs (Pathak et al., 2006).

Pour que les CMLVs puissent générer de la thrombine, il est indispensable d'avoir de la prothrombinase sur une surface de phospholipides membranaires anioniques (phosphatidylsérine ou PS) apportée par des CMLVs apoptotique (Flynn et al., 1997) ou non apoptotique (Pathak et al., 2006), du facteur tissulaire (FT) synthétisé par les CMLVs (Taubman et al., 1993), des facteurs Va, Xa, VIIa, du calcium (**Figure 7**).



**Figure 7 : Schéma de génération de thrombine à la surface des CMLVs.** Pour générer de la thrombine (FIIa) à partir de prothrombine (FII), les éléments indispensables sont les facteurs VII activé, X activé, le V activé, le facteur tissellaire, des surfaces phospholipidiques anioniques (PPL), un récepteur et du calcium.

La reconnaissance de la prothrombine par les CMLVs dépend de la présence et de l'activation de son récepteur membranaire : l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  sous sa forme activée (Byzova and Plow, 1998; Dardik et al., 2002). Son activation est nécessaire pour fixer la prothrombine à la surface des CMLVs. Cette séquence permet de générer de la thrombine au niveau des CMLVs

En effet, la prothrombine peut se lier au récepteur de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  à la surface des CEs *via* le motif RGD (Bar-Shavit et al., 1991; Byzova and Plow, 1997; Maragoudakis et al., 2000). Bien qu'il n'y ait pas de preuve qui montre la liaison directe entre la thrombine et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  dans les CMLVs, les antagonistes de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  inhibent la prolifération et la formation de l'adhésion focale induites par la prothrombine dans les CML (Sajid et al., 2003).

Une exposition des CMLVs à une contrainte mécanique cyclique augmente la génération de thrombine après 60 et 360 min et notamment par le biais d'une surexpression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Mao et al.,

2012b). De plus, la thrombine générée est capable de stimuler la prolifération, la migration et la production de facteurs de croissance des CMLVs via sans doute son récepteur PAR-1 ou par l'activation de JNK (Jun amino terminal kinase) (Stouffer and Smyth, 2003).

La génération de thrombine nécessite l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  pour l'adhésion de la prothrombine (Byzova and Plow, 1997) et dépend de la signalisation « outside-in » et « inside-out » de l'intégrine. La signalisation de l'intégrine permet le recrutement rapide des molécules d'adhésion focales comme Src et FAK (Focal Adhesion Kinase) en réponse à des contraintes mécaniques (Mao et al., 2012b). En effet, FAK est une protéine importante dans la transmission du signal relargué par les intégrines et est impliquée dans plusieurs processus cellulaires comme la migration, la survie et la prolifération. L'expression de Src (proton-oncogène issu d'un sarcome) qui est également impliquée dans ces processus cellulaires, dépend de l'expression et de l'activation d' $\alpha_v\beta_3$  (Mitra and Schlaepfer, 2006). Ces protéines servent à la fois comme complexe pour s'accrocher et phosphoryler plusieurs protéines en aval de la signalisation des intégrines afin de traduire le signal mécanique en signal biochimique.

Parmi les autres protéines, on retrouve les protéines du cytosquelette comme la taline qui peut être activée par des contraintes mécaniques et joue un rôle important dans la voie de signalisation bidirectionnelle de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Critchley and Gingras, 2008; Harburger and Calderwood, 2009; Moser et al., 2009). La taline est susceptible de se lier aux intégrines et d'augmenter la signalisation. L'absence de la taline mène à une interruption du signal « outside-in » induite par les contraintes mécaniques tandis que l'inhibition de la taline empêche l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  par la voie « inside-out ». (Tadokora *et al.*, 2003). Le clivage permet la libération de la tête de la taline qui se lie à la queue de la sous-unité  $\beta_3$  pour l'activer (Bottcher et al., 2009). Lorsque l'intégrine est activée, les CMLVs adhèrent en plus grand nombre à la prothrombine (Byzova and Plow, 1998; Stouffer and Smyth, 2003).

### f) CMLVs et génération de thrombine dans les conditions physiopathologiques

Les complications liées aux pathologies vasculaires comme l'HTA, les anévrismes ou encore l'athérosclérose impliquent en partie des mécanismes de l'hémostase.

La génération de thrombine à la surface des CMLVs est enclenchée par une lésion endothéliale. Dans le cas de l'hypertension, l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  en réponse aux contraintes mécaniques *in vivo* participe au remodelage eutrophique de la paroi artérielle (Heerkens et al., 2006). Cette activation peut augmenter le risque thrombotique. La thrombine pourrait stimuler sa propre production à la surface des CMLVs en présence de FT (Vidwan et al., 2010) mais également intervenir directement sur les CMLVs en induisant la prolifération, la migration (Martin et al., 2009) et la formation des plaques

d'adhésions focales dans les CMLVs (Sajid et al., 2003). La thrombine peut donc participer à la modulation des CMLVs qui libèrent des facteurs procoagulants dans le compartiment sanguin et vasculaire (Patterson et al., 2001; Stouffer and Smyth, 2003).

D'autres part, les intégrines  $\alpha_{IIb}\beta_3$ - $\alpha_v\beta_3$  auraient un effet thrombotique lors de l'hémorragie de la plaque d'athérome. La fibrine, le FT et l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  favorisent la thrombose dans le développement et la rupture des plaques d'athérosclérose (Choudhury *et al.*, 2007. (Borissoff et al., 2009). Il est souhaitable de compléter cette réflexion par une compréhension des déterminants génétiques qui participent également à la maladie.

### 3) L'intima : les cellules endothéliales (CE)

Les CE (ou endothélium) ont un rôle fondamental dans un large panel de processus physiologiques tels que la régulation de l'hémostase, du tonus vasculaire, de l'immunité ou encore des réponses inflammatoires. Un des rôles principaux de l'endothélium est sa propriété anticoagulante (ou antithrombogène) en séparant le sang de la partie thrombogène constituant la lame basale (Galley and Webster, 2004).

En dépit de leur origine commune, ces cellules présentent des phénotypes très variables dépendant de leur localisation dans l'arbre vasculaire (artères et veines). La réponse cellulaire pour un même stimulus diffère selon la localisation des CE (Michiels, 2003; Pries et al., 2000).

L'état de l'endothélium et sa dégradation vont influencer des processus allant de l'immunité à l'hémostase. Un mauvais fonctionnement peut se traduire par la sécrétion anarchique de différentes molécules (angiopoietine-2, CD146, facteur von Willebrand (vWF)), cet état est appelé « activation endothéliale ». L'atteinte globale des fonctions des CEs est appelée « dysfonction endothéliale » (Flammer et al., 2012; Lee and Liles, 2011).

## III. Les intégrines et leurs rôles dans la génération de thrombine

### 1) Généralités sur les intégrines

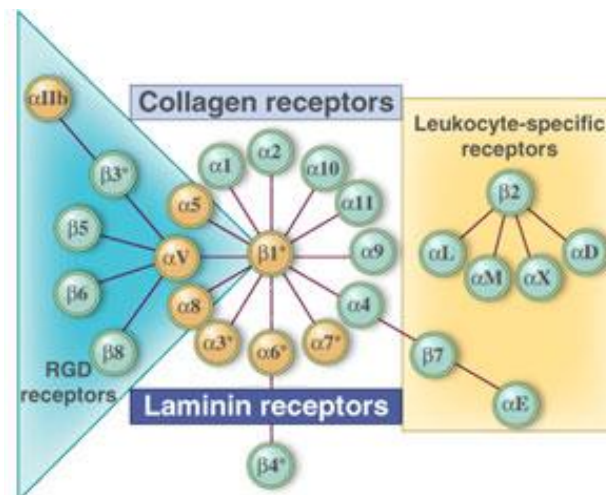
Les intégrines sont des récepteurs cellulaires hétérodimériques constitués de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  transmembranaires. Actuellement, on dénombre 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  qui s'associent entre elles pour former 24 intégrines différentes. Elles sont présentes à la surface des cellules

adhérentes des organismes multicellulaires et se lie à plusieurs constituants de la matrice extracellulaire (MEC).

Les intégrines sont fortement exprimées sur certains types de cellules tels que les fibroblastes, les plaquettes, les cellules tumorales, les CEs néoformées ainsi que sur les CMLVs.

Les intégrines ont un rôle dans l'adhérence cellulaire en interagissant notamment avec les microfilaments d'actine du cytosquelette des CEs et certains constituants de la MEC. Parmi ces dernières, il faut citer le collagène, la laminine, la fibronectine ou encore la vitronectine (Rovensky, 1998). Les intégrines n'ont pas de d'activité enzymatique intrinsèque mais forment des complexes sur les rafts lipidiques membranaires avec des kinases et d'autres protéines qui transmettent des informations de part et d'autre des cellules vasculaires afin que ces dernières interagissent avec leur environnement (Jin et al., 2004). Les informations transmises incluent des variations intracellulaires de calcium et de pH, la synthèse d'inositol ainsi que des phosphorylations de diverses protéines, telles que FAK, Src ou Ras, conduisant à la formation de signaux de survie.

La spécificité de liaison dépend du domaine extracellulaire des sous-unités  $\alpha$ . Les intégrines présentes *in vivo* dans les CMLs adultes sont  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$ , et permettent des liaisons avec des séquences spécifiques (par exemple, un ligand portant une séquence RGD). Elles sont donc classées comme des récepteurs du collagène, des récepteurs de séquences RGD, des récepteurs de laminine et des récepteurs spécifiques des lymphocytes (**Figure 8**).



**Figure 8 : Classification des intégrines.** Adaptée d'après (Hynes, 2002)

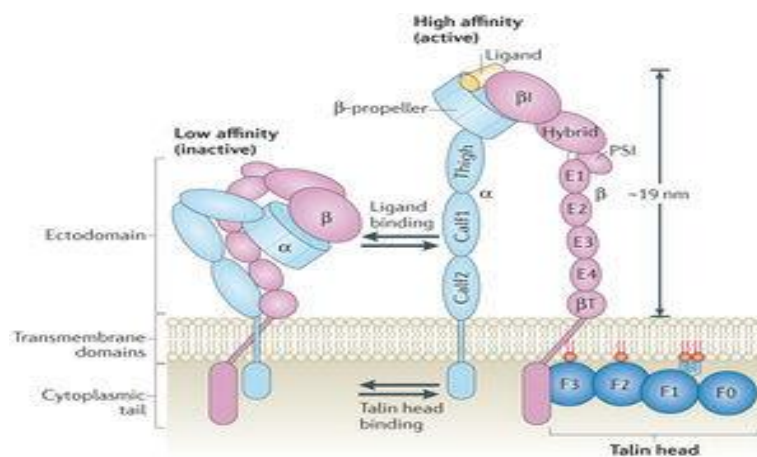


## 2) L'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Dans un tissu sain, les vaisseaux n'expriment pas ou faiblement cette intégrine (Brooks et al., 1994; Max et al., 1997). Cette intégrine est présente également à la surface des cellules épithéliales et intestinales, des macrophages ou encore des ostéoclastes (Natali et al., 1997). L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est connue pour être surexprimée au cours du remodelage vasculaire et l'angiogenèse au niveau des CE.

### a) Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

La structure cristallographique de la partie extracellulaire de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a été décrite par l'équipe du Pr. Arnaout en 2001 (Xiong et al., 2001). Les études structurales ont permis de mieux comprendre le fonctionnement et le mécanisme d'activation des intégrines dont notamment les deux conformations adoptées par la partie extracellulaire de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Xiong et al., 2002). Lorsque l'intégrine est dans sa structure repliée, elle est inactive et lorsqu'elle est dans sa structure étendue, elle est active. (Figure 9).



**Figure 9 : Structures repliées et étendues d'une intégrine.** Adaptée d'après (David A. Calderwood et al., 2013)

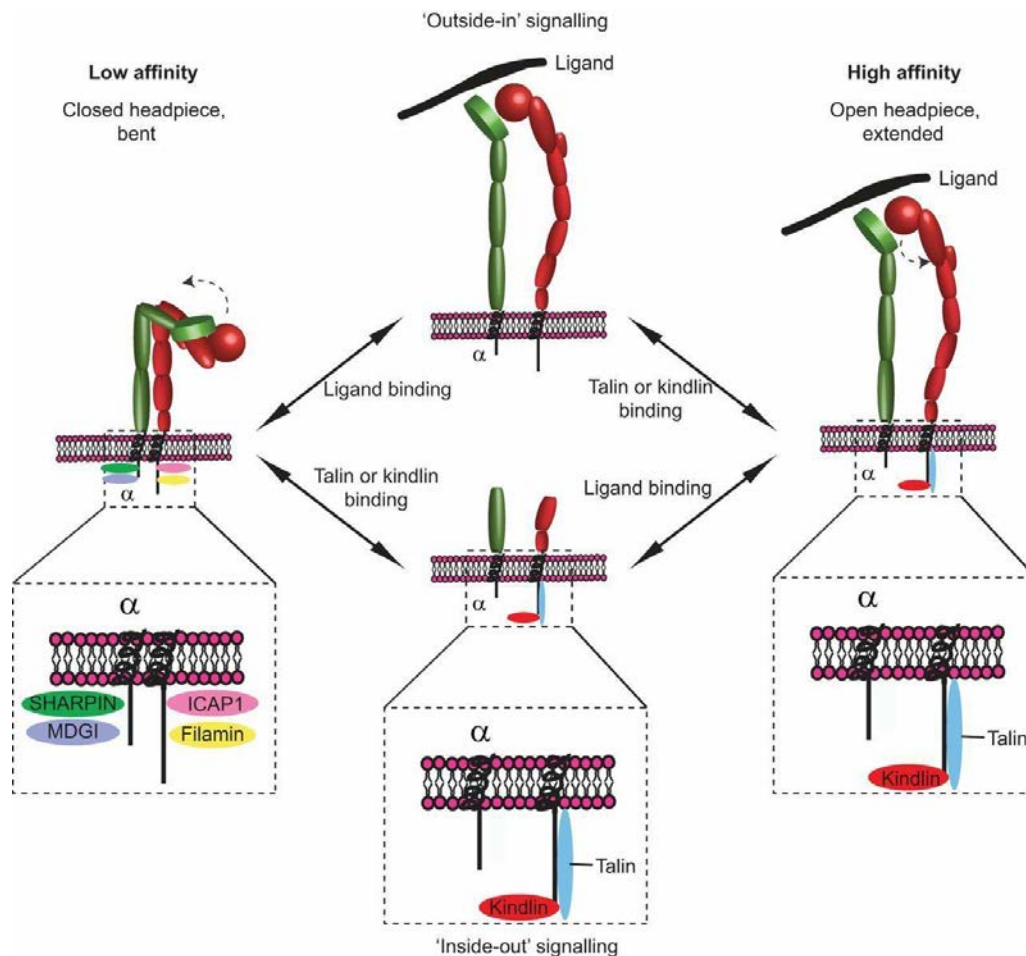
La partie intracellulaire des intégrines est un site de liaison pour la taline, une protéine du cytosquelette, indirectement liée au microfilament d'actine.

### b) Fonctions des intégrines

Les intégrines exercent deux fonctions principales :

- l'interaction cellule-MEC. Les intégrines se regroupent sous forme de complexes ou « clustering » qui augmentent leurs activités pour les ligands.
- la transduction des signaux de la MEC vers la cellule. L'intégrine transmet des signaux à travers la membrane plasmique de manière bidirectionnelle par une signalisation (Figure 10) :

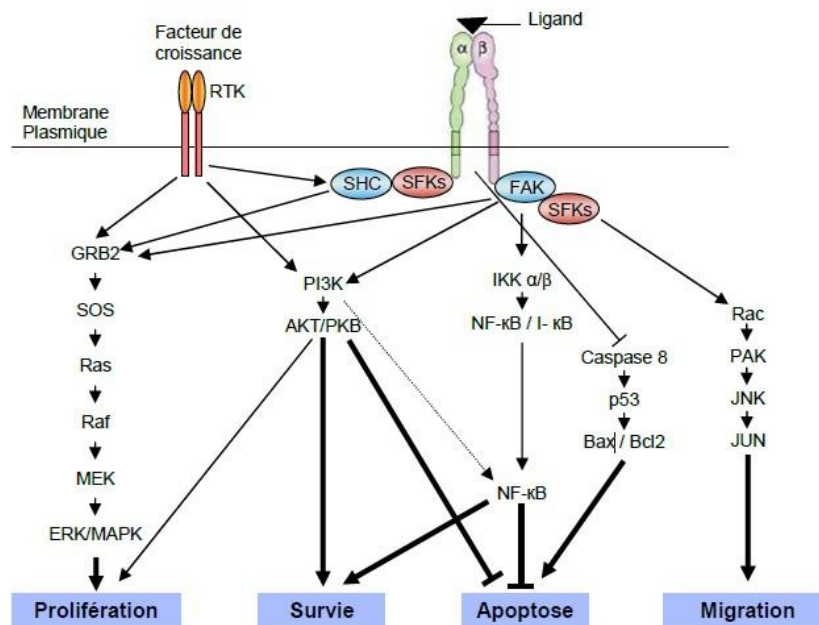
- « inside-out ». L'activation de la signalisation « inside-out » résulte en une augmentation de l'affinité de l'intégrine pour son ligand extracellulaire (Takagi et al., 2002; Takagi and Springer, 2002). Des études structurales, réalisées à l'aide d'anticorps, ont montré que l'activation des intégrines correspond à un changement conformationnel, initié au niveau des parties cytoplasmiques se propageant à travers les parties transmembranaires jusqu'aux domaines extracellulaires (Calderwood, 2004; Liddington and Ginsberg, 2002; Takagi et al., 2002)
- « outside-out ». Il est clairement établi aujourd'hui que les intégrines ne se limitent pas à lier des protéines adhérentes extracellulaires mais qu'elles agissent également en tant que véritables récepteurs transmettant une information au niveau intracellulaire. La signalisation « outside-in » est un mécanisme commun des récepteurs membranaires et qui n'est donc pas propre aux intégrines. La plupart des ligands des intégrines sont multivalents, leur interaction avec la partie extracellulaire des intégrines induit le regroupement des intégrines au niveau de la membrane plasmique en complexes appelés «clusters». Ces complexes peuvent alors recruter des protéines de signalisation au niveau cytoplasmique et induire des cascades de signalisation intracellulaire. Il est généralement admis que c'est le regroupement des intégrines qui induit la transduction de signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Abram and Lowell, 2009; Giancotti and Ruoslahti, 1999).



**Figure 10 : Représentation schématique des deux conformations de l'intégrine.** A gauche, dans la conformation inactive (faible affinité pour les composants de la MEC), les sous-unités d'intégrine  $\alpha$ - et  $\beta$  sont proches avec la tête penchée vers la membrane plasmique. La liaison au domaine cytoplasmique des intégrines de la SHARPIN ou de MDGI à la sous-unité  $\alpha$  ou de ICAP1 ou de la filamine (pour les sous-unités  $\beta$ ) stabilisent l'hétérodimère d'intégrine dans cette conformation de faible affinité. La formation de la conformation de haute affinité nécessite à la fois l'extension des domaines extracellulaires et la séparation de la sous-unité  $\alpha$  de la sous-unité  $\beta$  de l'intégrine, ce qui entraîne une conformation activée « headpiece » (à droite). La formation de cette conformation de haute affinité activée peut être déclenchée soit par la liaison de composants de la MEC au domaine extracellulaire de l'intégrine. C'est la signalisation dite "outside-in" ou soit par l'association de la taline et de la kindline au domaine cytoplasmique de la sous-unité d'intégrine  $\beta$  en réponse à un signal intracellulaire appelé "inside-out" comme le montre la signalisation au centre du schéma. Dans le schéma dépeignant la signalisation «inside-out», les domaines extracellulaires des intégrines ont été omis pour une plus grande clarté (Pouwels et al., 2012).

La partie interagissant avec les constituants intracellulaires contrôle des molécules de signalisation. En particulier, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  participe à la survie cellulaire. En effet, l'administration d'un antagoniste de

l'intégrine va entraîner la mort vasculaire. L'activation et la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B sont impliquées dans cette fonction spécifique de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  sur la survie cellulaire.



**Figure 11 : Voies générales de signalisation régulées par les intégrines et les facteurs de croissance** (SFK = Famille de tyrosine kinases). Adapté d'après (Guo and Giancotti, 2004; Ruegg and Mariotti, 2003).

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  participe à l'adhésion cellulaire en liant certains composants de la MEC tels que la vitronectine, la fibronectine ou le fibrinogène, indépendamment de la présence de facteurs de croissance (Eliceiri, 2001). Elle est également capable de coopérer de façon particulière avec le facteur de croissance b-FGF. Cette association entraîne l'activation de la voie du NF- $\kappa$ B, du facteur de transcription ERK et l'entrée de calcium intracellulaire induisant la réorganisation du cytosquelette, la formation de fibres de stress et l'adhésion cellulaire.

### c) Rôles de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  peut se lier à différents ligands tels que la fibronectine et la vitronectine grâce au motif peptidique RGD (Arginine - Glycine - Acide aspartique) qu'ils contiennent. D'autres intégrines ont également la capacité de reconnaître le motif RGD, notamment  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_{11}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$  et  $\alpha_v\beta_8$ . Elle s'active en présence de VEGF, de b-FGF, de TGF- $\beta$ 1 et en conditions d'hypoxie (Brooks et al., 1994; Friedlander et al., 1995; Gloe et al., 2002; Ruoslahti et al., 1994). Par ailleurs, l'intégrine s'associe directement avec les récepteurs VEGF-R2, PDGF-R2 et IR (insuline receptor) et favorise l'angiogenèse (Eliceiri, 2001).

Chez la souris, l'inactivation génique de la sous-unité  $\alpha_v$  n'est pas viable contrairement à l'inactivation génique de la sous-unité  $\beta_3$  mais qui néanmoins induit des hémorragies à cause de l'absence de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  des plaquettes. Des mécanismes compensatoires de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  ont lieu impliquant les intégrines  $\alpha_v\beta_5$  et  $\alpha_5\beta_1$  (Eliceiri and Cheresh, 2000). Néanmoins, le fait d'invalider les gènes qui codent pour la sous-unité  $\beta_3$  ne va empêcher ni l'angiogenèse ni la vasculogenèse ce qui rend difficile l'explication des rôles précis de cette intégrine alphav. De plus, les souris  $\beta_3$ -null, comme les  $\beta_5$ -null, développent une angiogenèse très active en réponse au VEGF, à l'hypoxie ou au développement tumoral (Reynolds et al., 2002).

La migration cellulaire est un processus régulé par des variations de composants cellulaires et matriciels. La cellule doit acquérir une asymétrie spatiale pour générer les forces nécessaires à son déplacement. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a un rôle majeur dans la migration des CE : la présence d'antagonistes d' $\alpha_v\beta_3$  réduit la mobilité cellulaire en diminuant physiquement les interactions cellules / matrice et/ou en altérant le signal intracellulaire transmis (Rupp et al., 2004). Plus précisément, la sous-unité  $\alpha_v$  semble jouer un rôle fondamental dans l'adhésion cellulaire.

**Tableau 1 : La famille des intégrines.** Les sous-unités d'intégrines capables de reconnaître  $\alpha_v$ .

$\alpha_v$ partner	Other $\alpha$ possible ?	Common ligands	Types of cells	KO (effects)
$\beta_1$	$\alpha_1$ -11	VN, FN, virus	Endothelial cells	
$\beta_3$	$\alpha_{IIb}$ (platelet receptor)	VN, FN, Fbg, Fb, CCN family proteins, TN, virus, Disintegrins, LM, denatured COL I, II,IV, bFGF, osteonpontin, bone sialoprotein, L1CAM, thrombin, thrombospondine	Endothelial cells, Smooth Muscle cells	Itgb3 -/- : no TRP defective platelet aggregation, defective osteoclast resorptive capacity, and osteosclerosis, transplanted tumours grow more rapidly
$\beta_5$	Only $\alpha_v$	VN, Fb, virus	Endothelial cells, Smooth Muscle cells	Itgb5 -/- : no TRP development, wound healing, and angiogenesis, b5 knockout mice were also protected from brain infarction in a model of ischemic stroke induced by carotid artery occlusion and reperfusion
$\beta_6$	Only $\alpha_v$	VN, FN, FGFB-LAP, Fibrillin, virus	Epithelial cells (expressed at relatively low levels in healthy tissue and significantly up-regulated during development, injury, wound healing, and in epithelial tumors)	Itgb6 -/- : Lymphocyte-predominant lung inflammation, reduced Langerhans cells, late-onset lung emphysema because of increased MMP-12, reduced fibrosis.
$\beta_8$	Only $\alpha_v$	VN, Fb, FGFB-LAP, virus	Epithelial cells (up-regulated in ovarian carcinoma cells lines and melanome) Dendritic cells	Itgb8 -/- : Variable embryonic lethality because of vasculogenesis failure, CNS hemorrhage, cleft palate ( $\pm 10\%$ ); conditional KO in dendritic cells causes mild

### 3) Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  se rapproche structurellement et fonctionnellement de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . De ce fait, elle reconnaît également le motif peptidique RGD et notamment la fibronectine. Cette intégrine est exprimée essentiellement à la surface des plaquettes et des mégacaryocytes. En fonction de l'état d'activation des cellules, son niveau d'expression varie de 40 000 à 80 000 intégrines par cellules. Elle participe à l'agrégation, l'étalement cellulaire ainsi qu'à la rétraction du caillot (Shattil, 1995).

### 4) Thrombine et activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

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

Il y a une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  dans les CMLVs stimulées par la thrombine (Brown et al., 1994). L'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est nécessaire pour l'adhésion de la prothrombine aux surfaces des CMLs (Byzova and Plow, 1998; Dardik et al., 2002). Le traitement des CMLs par la thrombine aboutit à une formation rapide des fibres de stress, à une réorganisation du cytosquelette d'actine et à l'assemblage des plaques d'adhésions focales (Ishida et al., 1999).

## IV. Déterminants génétiques cardiovasculaires et modèles de thromboses

### 1) Les déterminants génétiques impliqués dans les pathologies cardiovasculaires

De nombreuses pathologies (infarctus du myocarde, diabète de type 2 ou accidents vasculaires cérébraux) et facteurs de risque cardiovasculaire ont une importante composante génétique. Bien que le risque cardiovasculaire soit défini par la somme des facteurs de risques connus (âge, sexe, tabac, pression artérielle et cholestérol), prédire les maladies avant qu'elles soient diagnostiquées a incité la recherche à tester, à l'aide des études d'associations pangénomique (GWAS pour Genome Wide

Association Study), l'association entre variations génétiques et risque de contracter une maladie commune.

On distingue deux types de maladies génétiques. Les maladies monogéniques héréditaires et les maladies multifactorielles qui sont déterminées par la conjonction de plusieurs variants génétiques ou mutations génétiques et de facteurs de risques environnementsaux et comportementaux.

### a) Maladies héréditaires monogéniques

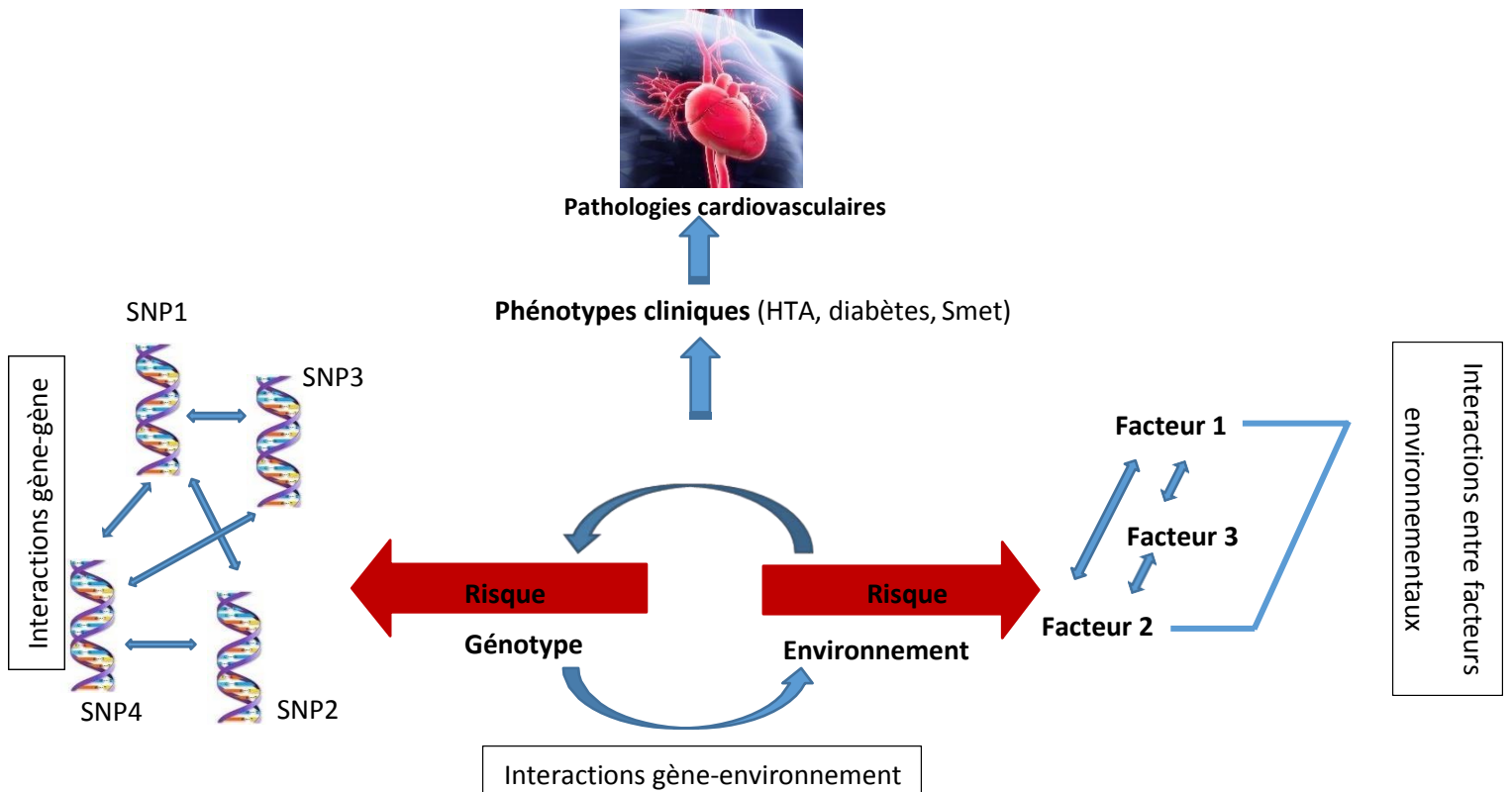
Ce type de maladie se caractérise par le fait qu'un seul gène altéré mène à un état pathologique. On dénombre environ 2000 maladies héréditaires monogéniques. Les anomalies géniques responsables de ces maladies concernent des mutations ponctuelles dans lesquelles un exon va entraîner un changement d'un acide aminé de la chaîne polypeptidique correspondante. Une mutation non-sens qui provoque l'apparition d'un codon STOP qui raccourcit la chaîne. Est également concerné, la délétion d'un nucléotide qui induit un décalage du cadre de lecture et une synthèse anormale dans sa structure. On peut avoir une délétion une mutation ponctuelle dans un intron ou dans les zones régulatrices, expansion de triplet dans un exon ou une inversion intragénique. Le modèle le plus connu concerne la mucoviscidose dont la mutation la plus fréquente est une délétion de trois nucléotides qui correspond à la perte d'un codon Phénylalanine en position 508. Néanmoins certaines mutations peuvent être bénéfiques ou protectrices (exemple de l'hémoglobine S dont la mutation protège les porteurs du paludisme).

### b) Maladies génétiques multifactorielles

Les maladies multifactorielles font intervenir des composants génétiques complexes dans des interactions entre les facteurs génétiques et les facteurs environnements. La physiopathologie cardiovasculaire comporte une grande partie d'héritabilité. En effet, pour certaines pathologies, l'estimation de l'héritabilité est bien documentée, par exemple le SMet présente 38 à 61 % d'héritabilité (Bayoumi et al., 2007; McQueen et al., 2003), l'hypertension est à 17 à 49 % d'héritabilité (Brown et al., 2003; McQueen et al., 2003) ou encore l'athérosclérose pour laquelle on a 5 à 84 % d'héritabilité (Cassidy-Bushrow et al., 2007; Fischer et al., 2005; Wienke et al., 2005; Zdravkovic et al., 2002).

La grande majorité des variants génétiques sont single nucleotide polymorphisms (SNP), c'est-à-dire des modifications d'une seule paire de bases d'ADN. Les SNPs sont localisés sur l'ensemble du génome humain (sauf le chromosome Y). Les études d'association pangénomique ou GWAS utilisent des cartes denses de SNPs afin de rechercher des associations entre les variants et le phénotype étudié. La plupart des variants génétiques, associés à ce jour aux facteurs de risque et aux pathologies cardiovasculaires de type polygénique ont un effet faible sur le trait phénotypique (par exemple : moins de 1 mmHg sur

la pression artérielle). Les maladies complexes communes sont gouvernées par plusieurs SNPs dans plus de 1 à 5 % de la population étudiée dans les GWAS. Comme il existe de très nombreux variants génétiques avec un effet additif, les chercheurs ont créé des scores génétiques prenant en compte de tous les variants identifiés dans une situation donnée (**Figure 12**).



**Figure 12 : Interactions gène-environnement impliquées dans les maladies cardiovasculaires multifactorielles (d'après Saleh, 2015).**

Un exemple récent illustrant bien ce propos est l'association génétique très robuste d'un locus sur le chromosome 9p21 avec le risque de maladie coronarienne. Cette association a été découverte en 2007 (McPhearson et al., 2007). Ce locus est associé à de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que les anévrismes, l'infarctus du myocarde ou encore les calcifications coronaires (Loinard et al., 2014). Malgré de très nombreuses études réalisées depuis lors, nous ne savons toujours pas précisément, en 2011, pourquoi ce locus est associé à la maladie coronarienne. Bien qu'il soit possible que cette découverte aboutisse un jour à de nouvelles mesures thérapeutiques et/ou préventives pour la maladie coronarienne, beaucoup d'incertitudes persistent.



### 2) Modèles animaux de thromboses

Une activation exacerbée des mécanismes de l'hémostase peut conduire à une thrombose artérielle qui aboutit à l'obstruction totale du vaisseau (Lip and Gibbs, 1999; Lip and Li-Saw-Hee, 1998). Lors d'une brèche vasculaire, les plaquettes adhèrent au sous-endothélium par l'intermédiaire du facteur Willebrand (FvW) et du collagène. Puis elles s'activent et sécrètent le contenu de leurs granules et finissent par s'agréger entre elles et forment un thrombus qui obstrue le vaisseau.

L'étude des mécanismes impliqués dans le développement des thromboses nécessite de disposer de modèles animaux. Chez l'homme, les études utilisent des marqueurs biologiques ou des échantillons de tissus (vaisseaux) mais il n'est pas possible de modifier génétiquement, de manipuler, ou d'examiner *in vivo* les mécanismes biologiques.

#### *Intérêts et limites des modèles murins*

L'utilisation de la souris comme modèle d'expérimentation présente de nombreux avantages. En effet, elle se reproduit très rapidement et compte jusqu'à 10 souriceaux par portée. Les principales lignées sont bien caractérisées génétiquement. La petite taille de la souris permet d'étudier l'effet *in vivo* d'un composé coûteux ou difficile à produire en grande quantité. Néanmoins, cette taille pose des difficultés techniques pour reproduire les pathologies rencontrées chez l'Homme.

L'obtention maîtrisée des animaux génétiquement modifiés permet désormais de manipuler et d'évaluer le rôle des différents acteurs de l'hémostase. De nombreux modèles expérimentaux de thromboses dans cette espèce se sont développés (Denis and Wagner, 2007; Jackson and Schoenwaelder, 2003; Ware, 2004). La structure des thrombi dans la souris, donnée par analyse histologique, est identique à celui de l'homme (Farrehi et al., 1998). L'inactivation de gène codant pour une pathologie humaine dans ces animaux (hémophilie, thrombasthénie de Glanzmann afibrinogénémie...) a permis de mimer les principaux phénotypes retrouvés dans les pathologies. De même, le thrombus murin est inhibé par des médicaments antiplaquettaires et anticoagulants. Ces résultats montrent que la thrombose dans un modèle de souris possède une similarité avec l'Homme ce qui est un argument en faveur de l'étude mécanistique du processus thrombotique (**Tableau 2**).

**Tableau 2 : Comparaison entre les plaquettes de la souris et de l'homme.**

Paramètres	Différences Homme/Souris
Numération plaquettaire	4 fois plus élevée chez la souris ( $1\ 100 \times 10^3$ plaquettes/ $\mu\text{L}$ )
Volume plaquettaire moyen	2 fois plus faible chez la souris ( $5\mu\text{m}^3$ )
Durée de vie des plaquettes	Souris : 3-4 jours Homme : 8-10 jours
Réactivité des plaquettes aux agonistes	Réactivité en réponse à la sérotonine est diminuée dans les plaquettes souris
Fréquence cardiaque moyenne	Souris : 550 battements/min Homme : 70 battements/min

Malgré tout, des différences d'espèces homme/souris sont à considérer dans l'interprétation des résultats et doivent mettre en garde contre l'extension à la pathologie humaine (Tsakiris et al., 1999).

Des difficultés dans les modèles de souris apparaissent lors de l'interprétation des résultats. La formation d'un thrombus dans un modèle de thrombose classique est étudiée dans un vaisseau sain alors qu'il intervient plutôt dans un vaisseau pathologique au niveau de lésions de l'athérosclérose mais les souris ne développent pas spontanément des lésions des plaques d'athéromes (Dorffler-Melly et al., 2000; Johnson et al., 1999). Il y a également une grande variabilité entre les différents fonds génétiques qui impact sur la numération plaquettaire, le nombre de récepteurs des plaquettes, les réponses aux tests de la coagulation et de réponse thrombotique (Li et al., 2004; Peters et al., 2002; Tsakiris et al., 1999).

L'âge, le sexe, l'état sanitaire, l'anesthésie, la température du corps ou le niveau d'oxygène sont des variables qui peuvent modifier les résultats finaux (Lindenblatt et al., 2005; Martini, 2007; Shimokawa et al., 2003). Dans les faits, la majorité des modèles publiés et couramment utilisés ne remplissent pas toutes les conditions d'un modèle « idéal ».

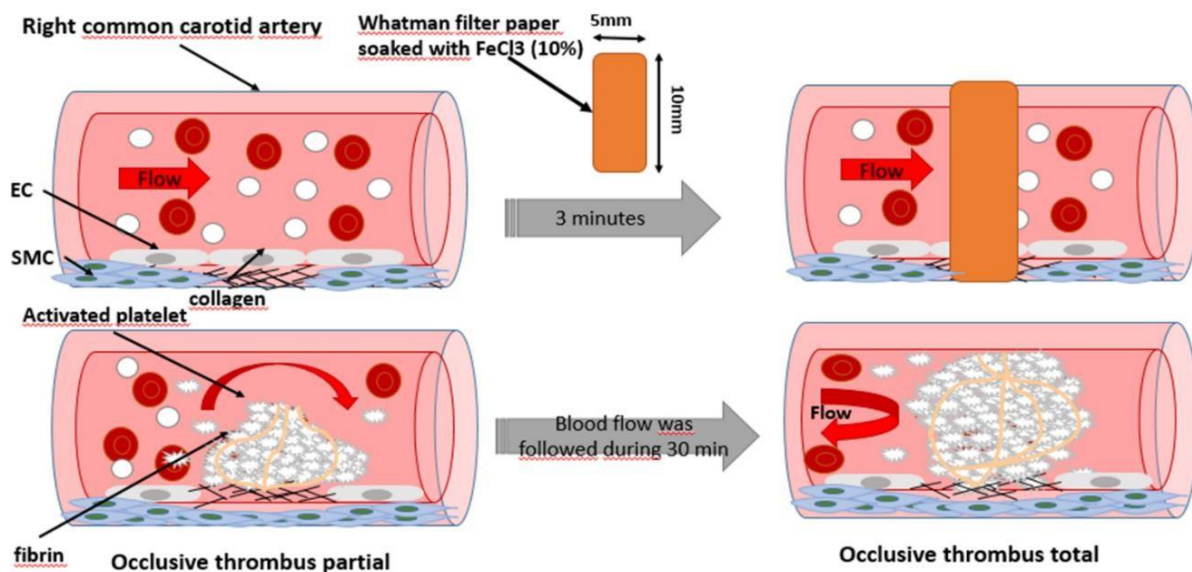
#### *Modèle au FeCl3*

A l'origine, le modèle de thrombose au FeCl<sub>3</sub> provient d'un modèle par application d'un courant électrique par l'utilisation d'électrodes en fer qui sont placés à la surface externe de la carotide de rat (Kurz et al., 1990). La formation du thrombus va alors dépendre des espèces réactives générées par les électrodes. L'application du FeCl<sub>3</sub> provoque une lésion vasculaire avec des mécanismes similaires à celles du courant électrique qui feraient intervenir la formation d'espèces réactives oxydantes qui endommageraient la cellule (Farrehi et al., 1998).

Ce modèle de thrombose induit par l'application d'un papier filtre saturé en chlorure ferrique directement sur la carotide (Farrehi et al., 1998) est le plus utilisé car il est simple d'utilisation. Le rôle des protéines de récepteurs impliqués dans l'hémostase et la thrombose a été mis en évidence grâce à ce modèle. L'évolution et l'arrêt du flux sanguin sont évalués grâce à une sonde Doppler dans le but de déterminer un temps d'occlusion (Jirouskova et al., 2004; Smyth et al., 2001). A la fin de l'expérience et après la mise à mort de l'animal, le thrombus formé durant l'expérimentation peut être recueilli pour être soit pesé soit analysé par histologie (Kurz et al., 1990; Zucker and Zucker, 1963a).

Pour les plus petites artères comme le mésentère et le crémaster, la lésion vasculaire peut être induite en perfusant une solution de  $\text{FeCl}_3$  (Denis et al., 1998) ou par application d'un papier filtre imbibé de  $\text{FeCl}_3$  (**Figure 13**) (Dubois et al., 2006; Pozgajova et al., 2006).

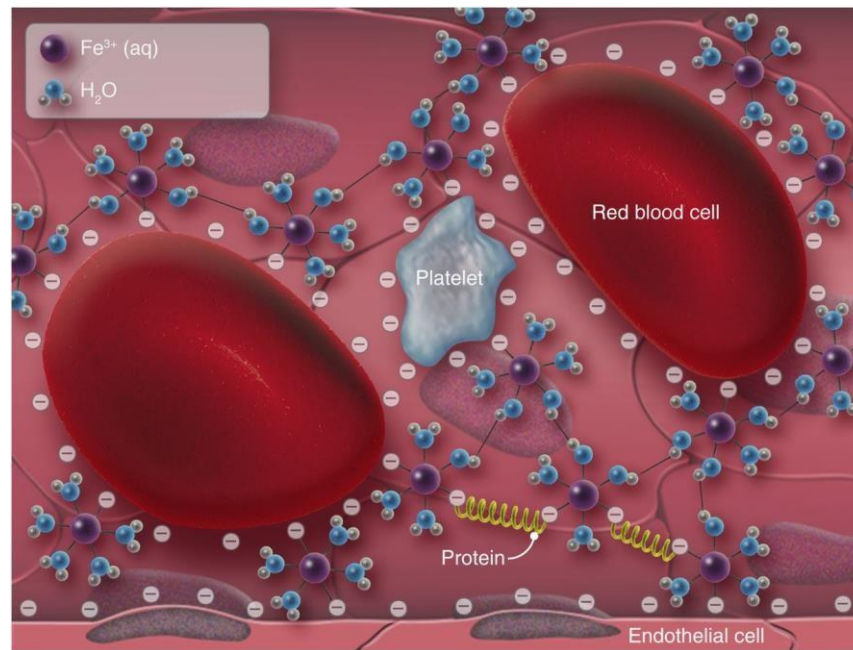
La thrombose peut être suivie par microscopie après injection de plaquettes fluorescentes, et des paramètres tels que le temps d'occlusion, le temps de formation du premier thrombus, l'embolisation ou la taille du thrombus peuvent être appréciés (Andre et al., 2003; Denis et al., 1998).



**Figure 13 : Schéma de thrombose carotidienne induite par le  $\text{FeCl}_3$  chez la souris.** La carotide d'une souris anesthésiée est disséquée et isolée du tissu environnant par un morceau de plastique. Un papier filtre imbibé de  $\text{FeCl}_3$  est appliqué sur l'adventice afin d'induire la formation d'un thrombus.

L'application du  $\text{FeCl}_3$  peut induire, selon sa concentration et le vaisseau, la desquamation de l'endothélium ou agir sur les CMLVs de la média (Konstantinides et al., 2001; Ni et al., 2000; Tseng et al., 2006). Des différences de réponses thrombotiques sont observées dans différents laboratoires qui sont dû aux différentes concentrations en  $\text{FeCl}_3$  et aux différents temps d'application du  $\text{FeCl}_3$  (Wang and Xu, 2005).

Le mécanisme d'action du  $\text{FeCl}_3$  sur la carotide est sujet à débat car les ions ferreux et ferriques traversent la paroi et lèsent les couches internes du vaisseau (Tseng et al., 2006) par des mécanismes non-déterminés. Une étude a montré que le collagène I de la paroi des artérioles mésentériques ou du crémaster serait exposé lors de l'application de fortes concentrations de  $\text{FeCl}_3$  (10%) pendant un temps prolongé (5 min) (Dubois et al., 2006).



**Figure 14 : Les ions ferriques traversent l'endothélium vers la lumière du vaisseau.** Les ions ferreux chargés positivement suppriment la charge négative portée par les cellules sanguines, les cellules endothéliales et des protéines plasmatiques, ce qui leur permet de former des agglomérats. Ce mécanisme basé sur la charge ionique permet aux cellules du sang et aux protéines de s'accumuler sur la paroi du vaisseau indépendamment des mécanismes hémostatiques (Neeves, 2015).

Dans la carotide, le thrombus occlusif est riche en plaquettes et fibrine et en globules rouges en aval de la lésion aux fortes concentrations de  $\text{FeCl}_3$  (10 et 20%) (Konstantinides et al., 2001; Smyth et al., 2001). La plupart des souris génétiquement modifiées ont été évaluées avec ce modèle.

# **Objectif général et Stratégies d'études**

---

Alors que la contribution des plaquettes a été très étudiée dans la génération-inhibition de la thrombine dans le compartiment sanguin, celle de la paroi vasculaire, qui est pourtant un des principaux facteurs déterminant la réponse thrombotique, reste mal connue. La paroi artérielle saine exerce un rôle anticoagulant tandis que la paroi désendothélialisée possède des propriétés procoagulantes. Plusieurs arguments biologiques suggèrent que la CMLV peut servir de support cellulaire pour la génération de thrombine dans la paroi vasculaire (thrombine tissulaire).

**Notre hypothèse** est que les échanges entre le compartiment sanguin et la paroi jouent un rôle crucial dans la génération de thrombine dans ces deux compartiments et que les changements phénotypiques des CMLVs dans des conditions pathologiques peuvent modifier ses propriétés pro- et anticoagulantes.

**L'objectif** a été d'étudier l'effet de la modulation des CMLVs sur la génération de thrombine dans le compartiment pariétal et le compartiment sanguin. Nous nous sommes focalisés sur différentes pathologies faisant intervenir ces deux compartiments, l'hypertension artérielle, le syndrome métabolique, la présence de variants génétiques associés aux pathologies cardiovasculaires mais également sur un modèle murin plus mécanistique avec délétion conditionnelle de la sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines à la surface des CMLVs.

Le syndrome métabolique (Smet) est défini par la présence simultanée de facteurs de risque incluant une obésité abdominale, une hypertension, une dyslipidémie et une résistance au glucose. Ces facteurs de risque sont associés à des modifications de la paroi artérielle, une activation de l'endothélium et la survenue d'évènements thrombotiques. L'hypertension, qui est l'une des composantes du Smet, est un facteur de risque important des maladies cardiovasculaires qui provoque des lésions vasculaires conduisant au remodelage de la paroi artérielle et à un état d'hypercoagulabilité. Dans un premier travail (chapitre 1), nous avons utilisé le rat spontanément hypertendu (SHR) pour déterminer la contribution des CMLVs sur la génération de thrombine tissulaire et la formation d'un thrombus artériel dans un contexte d'hypertension. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé le modèle du rat Zucker qui développe les mêmes anomalies que le Smet humain (obésité, hypertension, dyslipidémie, intolérance au glucose) et nous avons caractérisé le phénotype de coagulation et de fibrinolyse plasmatique, ainsi que la génération de thrombine à la surface des CMLVs de rats adultes (25 semaines) et âgés (80 semaines) pour étudier la contribution des effets métaboliques et du vieillissement sur la génération de thrombine tissulaire et plasmatique.

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est exprimée fortement à la surface des CMLVs et sert de récepteur pour la prothrombine. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  pourrait jouer un rôle majeur dans les propriétés mécaniques et dans l'hémostase du vaisseau du fait de son rôle de mécanosenseur et de sa capacité à lier la prothrombine. Dans le deuxième chapitre, nous avons étudié le rôle de l'invalidation conditionnelle de la sous-unité  $\alpha_v$  dans les CMLVs de souris sur le phénotype de la coagulation *in vitro* (génération de thrombine) et *in vivo* (modèles de saignement et de thrombose). En parallèle, nous avons évalué les propriétés inhibitrices, sur l'agrégation plaquettaire et l'adhérence de CMLVs à la vitronectine, de glycopeptides contenant une séquence RGD capable de lier l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Ces glycopeptides pourraient servir pour détecter en imagerie moléculaire des variations d'expression et de localisation de cette intégrine dans les pathologies cardiovasculaires.

Les pathologies cardiovasculaires ont pour la plupart une importante composante génétique. Un des premiers tournants dans la compréhension du lien mécanistique entre composante génétique et pathologies cardiovasculaires a été d'identifier un locus génomique (locus de susceptibilité 9p21) associé à une augmentation de ces pathologies. Ainsi dans un troisième chapitre, nous avons déterminé si le déficit des transcrits codés par ce locus prédispose à un phénotype pro-thrombotique.

## **Bien-être animal**

**D'après le Décret n° 2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013 relatif à la  
protection des animaux utilisés à des fins scientifique**

---



Notre laboratoire possède l'agrément d'établissement utilisateur (N° A 54-547-26 délivré le 26.02.2015)

### 1) La règle des 3 R

En 1959, W.M.S Russel et R.L Burch ont élaboré un programme visant à graduer les souffrances des animaux en expérimentation dans les laboratoires ; appelé la « règle des 3 R ».

Celui-ci comprend trois points (**Réduire, Raffiner et Remplacer**) que nous avons adoptés à toutes nos expérimentations.

- Nous avons utilisé un nombre d'animaux restreint et limité aux expériences considérées comme indispensables. Un protocole expérimental a été rédigé avant toute expérimentation et le nombre d'animaux nécessaires a été estimé par l'utilisation des statistiques lors de la conception du protocole.
- Le modèle animal a été choisi avec soin en prenant en compte les connaissances actuelles. Les conditions de transport, d'élevage et d'hébergement répondent à des critères très stricts comprenant l'enrichissement et le soin dans le but d'augmenter leur bien-être.
- Nos modèles *in vivo* ont été remplacés dès que cela s'est avéré possible par des modèles *in vitro*.

### 2) Les points limites

Afin d'éviter toute douleur et souffrance subies par les animaux, il est primordial de fixer des points limites. Quel que soit le protocole, nous avons déterminé les indicateurs de la douleur/souffrance et nous avons agi en conséquence si les critères d'interruption prédéfinis ont été atteints. En effet, l'expérimentation a été arrêtée si nous constatons un changement de l'aspect physique ou comportemental, réponses à des stimuli externes.

## Méthodes

---

Ce chapitre ne développe que les nouvelles méthodes mises en place au laboratoire.

### 1) Modèle de thrombose physiologique à la queue

Les souris sont pesées puis anesthésiées sur une platine chauffante à 37°C avec 2% d'isoflurane dans 0,5 L/min d'oxygène.

A l'aide d'un scalpel, l'extrémité de la queue de la souris est sectionnée à 3 mm puis la queue dans sa totalité est plongée dans du sérum physiologique (NaCl à 0,9 %) chauffé à 37°C pendant 10 s, 30 s, 5 min ou 20 min. Après ce laps de temps, une section de 5 mm de l'extrémité de la queue est obtenue à l'aide du scalpel, elle est plongée directement dans 10 mL de formaldéhyde à 10 % pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les échantillons sont rincés dans du PBS (Phosphate Buffered Saline contenant du NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM à pH 7,4) pendant 1 h à température ambiante puis déposés dans des caissettes remplis d'OCT (Optimal Cutting Temperature) qui seront conservées à -80°C.

Des coupes longitudinales épaisses de 7 µm des sections des queues de souris sont réalisées grâce à un cryostat (Leica). Les lames sont conservées à -20°C.

Les lames sont placées dans une cuve noire et humide puis rincées 10 min avec du PBS pour retirer l'OCT. Les échantillons sont incubés pendant 15 min dans du PBS-T (PBS contenant 0,05 % de Tween 20) avec 0,5 % de Triton X100 puis rincés 5 min dans du PBS-T. La zone d'incubation est délimitée à l'aide d'un feutre hydrophobe. Puis, la lame est incubée dans du PBS-T contenant 5 % de BSA (albumine bovine sérique) pendant 30 min afin de bloquer les sites de liaisons non-spécifiques.

L'anticorps primaire de lapin anti-fibrine/fibrinogène (Abcam ab34269) et l'anticorps primaire de rat anti- $\alpha_{IIb}$  (BD Pharmingen 553847 clone MWReg30) sont dilués dans du PBS-T contenant 1% de BSA et centrifugés pendant 10 min à 13000g pour retirer les agrégats. Les lames sont incubées pendant 2 h à température ambiante avec ces anticorps puis rincées 3 fois pendant 5 min dans du PBS-T.

Les anticorps secondaires anti-lapin (Dk@Rt 488) et anti-rat (Dk@Rb 549) sont dilués dans du PBS-T contenant 1% de BSA et centrifugés pendant 10 min à 13000g pour retirer les agrégats. Les lames sont incubées pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps et du Draq5 ou du Dapi pour marquer les cellules. Les lames sont à nouveau rincées 3 fois pendant 5 min dans du PBS-T.

Après avoir retiré tout l'excédent de liquide, une goutte de Flormount est déposée sur chaque lame qui est ensuite recouverte par une lamelle en évitant de créer des bulles d'air. Le montage est laissé à sécher 1 h à température ambiante. Les coins des lames sont recouverts avec du vernis. Les lames sont conservées à 4°C ou à -20°C pour une conservation plus longue.

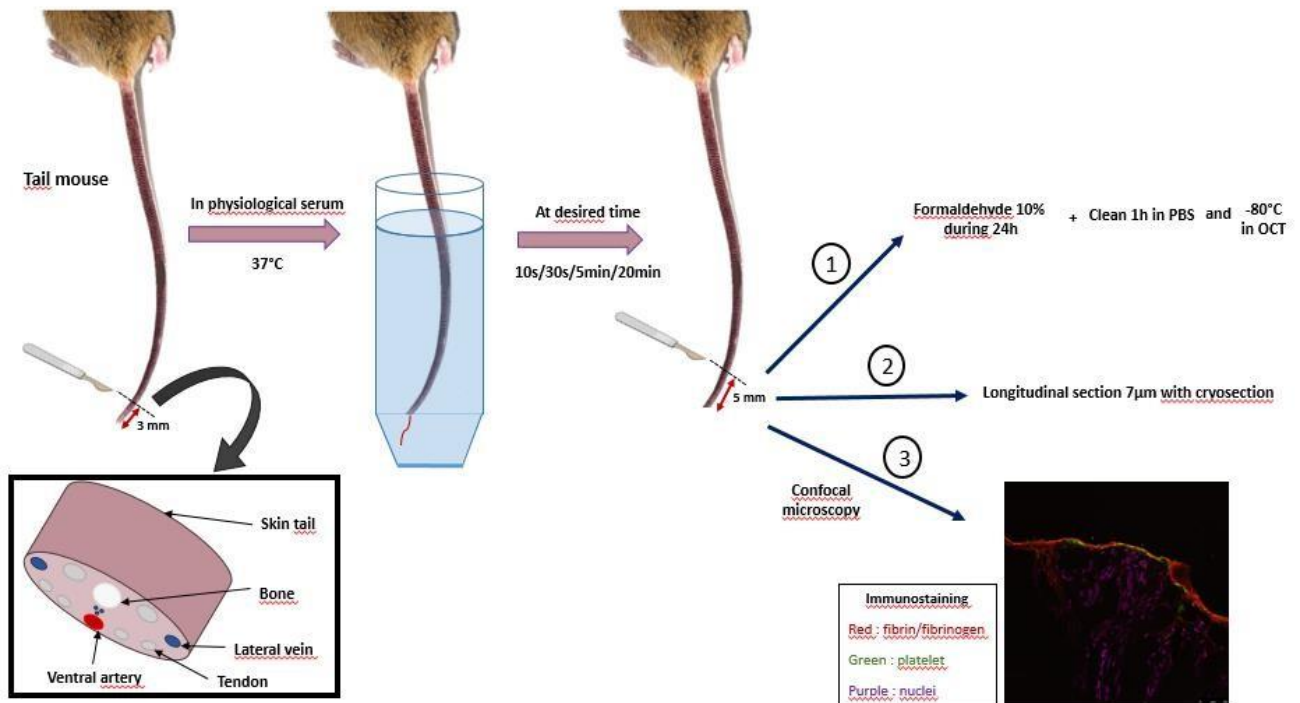
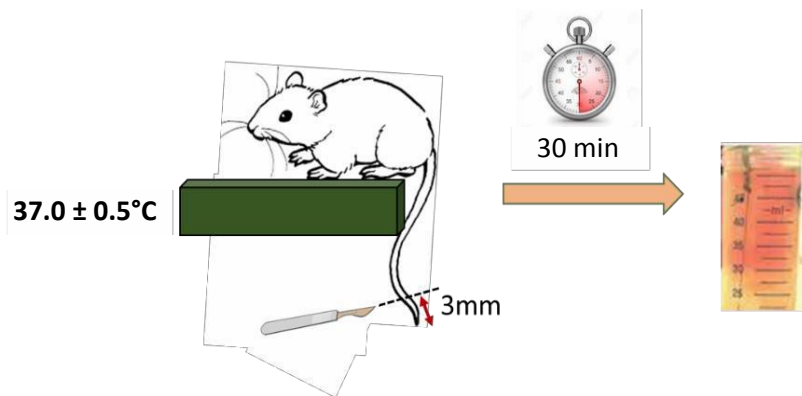


Figure 15 : Schéma récapitulatif de la procédure de formation et de l'imagerie d'un thrombus physiologique à la queue

## 2) Modèle de temps de saignement à la queue et mesure de l'hémoglobine

Le temps de saignement (TS) est mesuré selon la méthode décrite par Gruner et al. (Gruner et al., 2004).

Les souris sont pesées puis anesthésiées sur une platine chauffante à 37°C avec 2% d'isoflurane dans 0,5 L/min d'oxygène. La queue est sectionnée à 3 mm de son extrémité à l'aide d'un scalpel (**Figure 16**).



**Figure 16** : Schéma du modèle de saignement à la queue

L'écoulement libre du sang est suivi en plongeant la queue dans un tube Falcon® de 50 mL rempli de sérum physiologique chauffé à 37°C. Les arrêts et les reprises des saignements sont assidûment notés. L'expérience est limitée à 30 min. La durée du temps saignement est exprimée en secondes.

Le tube de sérum physiologique est récupéré à la fin pour mesurer l'hémoglobine selon le protocole de Liu et al. (Liu et al., 2014). Les cellules du sang sont séparées par une centrifugation à 4000 rpm/min pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est retiré et les érythrocytes sont re-suspendus dans 2 mL de tampon de lyse (ABX corporation). Après 10 min d'incubation dans le tampon de lyse, les tubes sont centrifugés à 10 000 rpm/min pendant 5 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm par spectrophotométrie et les concentrations d'hémoglobine sont calculées à l'aide d'une gamme étalon réalisée avec du sang de six souris contrôles.

### 3) Modèle de thrombose carotidienne induite par du chlorure ferrique

#### a) Préparation des animaux

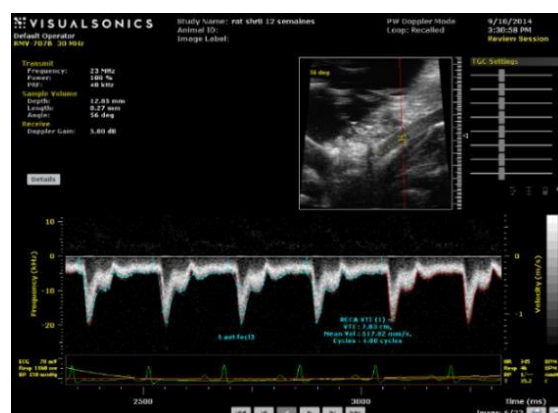
Les animaux sont pesés puis anesthésiés avec 2% d'isoflurane dans 0,5 L/min d'oxygène en décubitus dorsal sur une platine chauffante à 37°C reliée à une sonde rectale. La carotide droite est exposée par chirurgie puis une petite bande plastique est déposée en-dessous afin d'isoler la carotide du reste des tissus. Du gel échographique chauffé à 37°C est alors déposé délicatement sur la carotide pour pouvoir suivre l'évolution du flux sanguin par Echo-Doppler et donc l'occlusion de l'artère par la formation d'un thrombus.

#### b) Visualisation du flux avant l'application du chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>)

Grâce à une sonde de 30 MHz, le flux sanguin au travers de la carotide peut être visualisé sur l'appareil d'Echo-Doppler (RMV707B, 15-45 MHz, FUJIFILM Visualsonics Inc, Amsterdam, The Netherlands). Le gel est déposé sur la carotide puis le flux est mesuré avant l'application du chlorure ferrique (Figures 17 et 18).



**Figure 17** : Image échographique de la carotide droite en M-Mode

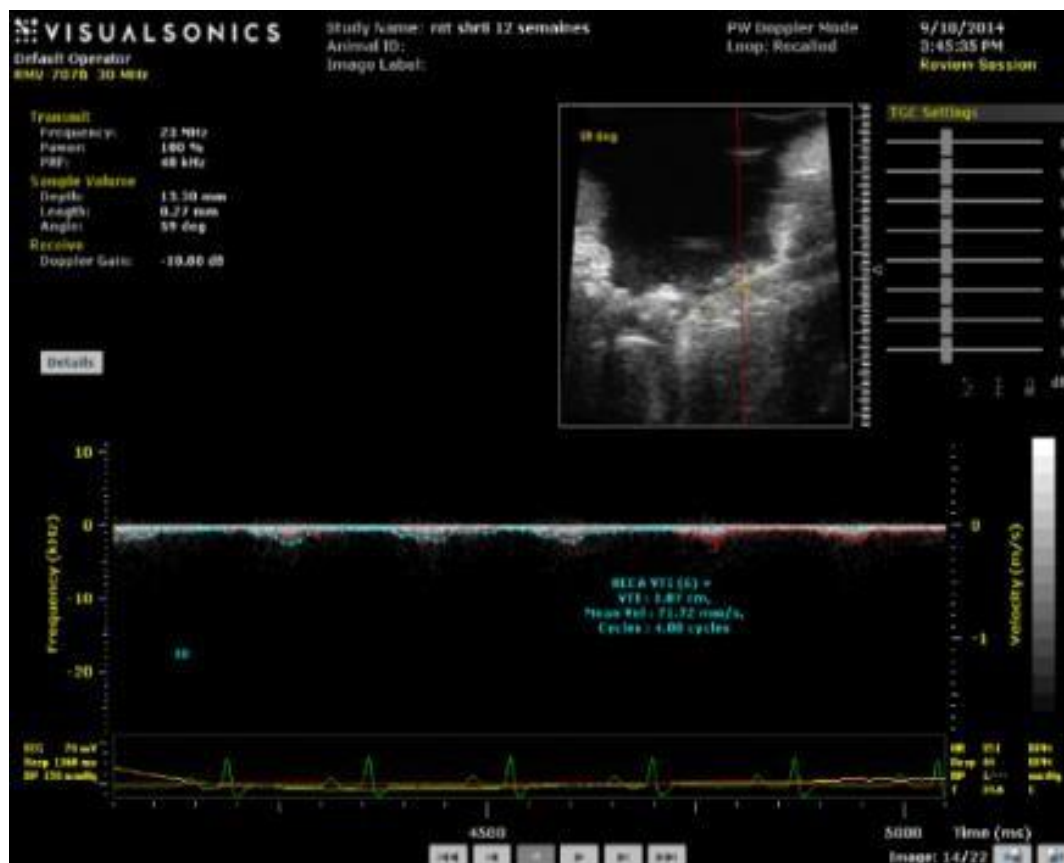


**Figure 18** : Image échographique du flux avant l'application du FeCl<sub>3</sub> sur la carotide

Le gel est alors retiré, la carotide nettoyée avec une compresse puis séchée avant l'application du FeCl<sub>3</sub>.

### c) Visualisation du flux après l'application de FeCl<sub>3</sub>

Du papier Whatman n°1 ayant pour dimensions 5 x 10 mm (L x l) pour le rat ou 1 x 0.5 mm pour la souris est saturé avec 10% ou 7,5% de FeCl<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). La formation d'un thrombus est initiée en appliquant ce papier-filtre sur l'extérieur de la carotide pendant 3 min. Le papier-filtre est alors retiré et la carotide nettoyée avec du sérum physiologique. Du gel échographique est à nouveau déposé. Le flux est enregistré pendant 30 min (**Figure 19**). Les carotides sont prélevées puis pesées. Le poids de la carotide droite contenant le thrombus est comparé à celui de la carotide controlatérale, la carotide gauche.



**Figure 19** : Image échographique après l'application du FeCl<sub>3</sub> sur la carotide

#### 4) Isolement et mise en culture des cellules musculaires lisses aortiques de souris

##### a) Isolement des cellules et mise en culture

L'obtention de CMLVs issues de la paroi aortique des souris est réalisée selon le protocole mis au point par l'équipe du Pr. J-B Michel (UMR\_S 1148).

Les souris sont anesthésiées avec 2% d'isoflurane dans 0,5 L/min d'oxygène puis perfusées en intracardiaque / intraortique avec 5 à 10 mL de PBS supplémenté en antibiotiques (100 U/mL de pénicilline-streptomycine) afin d'éliminer le sang, tout en faisant des allers-retours pour s'affranchir de la présence des CEs. L'aorte thoracique est prélevée en prenant garde à ne toucher ni le diaphragme (la limite entre le thorax et le péritoine) ni les organes digestifs afin d'éviter toute contamination bactérienne. Les aortes sont placées sur de la glace dans une boîte de pétri contenant du PBS additionné d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline-streptomycine). Le tissu adipeux et l'adventice sont retirés aseptiquement sous loupe binoculaire. L'artère est alors découpée en anneaux de quelques millimètres de longueur puis transférée dans un tube eppendorf contenant un mélange de collagénase à 1 mg/mL et d'élastase à 0,125 mg/mL (Worthington) et du milieu Low DMEM (Gibco®) qui sera incubé au bain-marie sous agitation pendant 20 min à 37°C. Les anneaux aortiques sont ensuite rincés trois fois avec du milieu Low DMEM contenant 10 % de SVF (Sigma®) et des antibiotiques (100 U/mL de pénicilline-streptomycine).

La suspension cellulaire est centrifugée à 1000 rpm/min pendant 5 min. Les cellules sont reprises dans 1,5 mL de milieu complet [contenant du milieu Low DMEM et 10 % de SVF, 100 U/mL de pénicilline-streptomycine et des fongicides (plasmocine à 2,5 µg/mL (InvivoGene) et primocine à 100 µg/mL (InvivoGene)]. Pour bien dissocier mécaniquement les cellules, une deuxième centrifugation est effectuée. Les anneaux et les cellules sontensemencés dans 800 µL de milieu par puits dans une plaque 6 puits préalablement incubée avec 400 µL de fibronectine à 50 µg/mL par puits. La plaque est laissée dans l'incubateur jusqu'au lendemain puis 800 µL de milieu complet sont ajoutés.

Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à confluence des cellules.

##### b) Entretien des cellules

Les cellules en culture sont rincées deux fois avec du PBS afin d'éviter une inhibition de la trypsine par le SVF. Un volume de 1 mL de trypsine-EDTA (0,05 %, Gibco®) pour une flasque de 25 cm<sup>2</sup> est



ensuite ajouté et les boîtes sont remises à l'étuve à 37°C pendant 2 min. Après vérification au microscope que les cellules sont bien décollées, le contenu des boîtes est alors transféré dans des tubes Falcon® de 15 mL avec 5 mL de milieu de culture Low DMEM additionné de 10% de SVF qui sont ajoutés afin de neutraliser l'action de la trypsine. Une centrifugation à 1500 rpm/min pendant 5 min à température ambiante est ensuite effectuée. Le culot de cellules est suspendu dans 1 mL de milieu complet, puisensemencé dans deux nouvelles flasques de 25 cm<sup>2</sup> pré-incubée avec 400 µL de fibronectine par puits à 50 µg/mL et complété avec du milieu (5 mL pour les flasques de 25 cm<sup>2</sup> pré-incubées avec 800 µL de fibronectine à 50 µg/mL).

### c) Immunocytochimie

Le phénotype des CMLVs de souris a été vérifié par un marquage de la myosine et l'α-actine du muscle lisse.

Les cellules en culture primaire dans des plaques de 48 puits sont rincées avec du PBS froid puis fixées avec du méthanol froid pendant 10 min. Après trois rinçages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées dans du peroxyde d'hydrogène à 1 % pendant 15 min. Les cellules sont lavées trois fois avec du TBS.T (Tris Buffered Saline contenant 0.05% Tween20) puis une étape de saturation est réalisée avec une solution TBS.T contenant 5 % de BSA pendant 30 min. Les anticorps primaires anti-myosine (1258841A4-Abcam) au 1/200 et anti-α-actine (A5228-Sigma) au 1/400 sont préparés dans du TBS.T contenant de la BSA à 1 %. Les échantillons sont incubés avec les anticorps primaires à 4°C pendant 1 nuit. Après trois lavages dans du TBS.T sans BSA, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires anti-lapin (Dako) pour la myosine et anti-souris (Dako) pour l'actine au 1/200 pendant 1 h à température ambiante. Des puits sont réservés pour les contrôles négatifs. Après trois lavages au TBS.T, la peroxydase de renfort (ou HRP pour *horseradish peroxidase*-Vector) est ajoutée pendant 30 min selon les recommandations du fournisseur. Les cellules sont ensuite rincées quatre fois avec du TBS.T avant d'ajouter le DAB substrate Kit (Vector) selon les recommandations du fournisseur. Pour arrêter la réaction, trois lavages avec de l'eau sont réalisés. Finalement, 50 µL d'eau sont ajoutés dans chaque puits. Les images sont prises à différents grossissements au microscope.

## **Chapitre 1**

# **Implication des CMLVs dans la génération de thrombine et la thrombose artérielle dans l'hypertension artérielle et le syndrome métabolique.**

---

## **I. Introduction et rationnel de l'étude**

Un certain nombre de pathologies cardiovasculaires présente à la fois des modifications de l'hémostase mais également des modifications structurales de la paroi artérielle. Pour l'heure, aucun lien direct entre l'implication des CMLVs dans la génération de thrombine et le développement de la maladie n'a été établi. Nous avons choisi de nous intéresser à 2 pathologies : l'hypertension artérielle et le syndrome métabolique qui ont en commun des modifications de la paroi induites par l'augmentation de pression.

### **1) L'hypertension artérielle**

L'hypertension artérielle (HTA) est l'un des principaux facteurs de risque cardiovasculaire qui entraîne une rigidification des artères du fait de la pression mécanique permanente qui s'exerce sur ces dernières. L'hypertension se caractérise par une altération du vaisseau qui conduit à un remodelage vasculaire et un état d'hypercoagulabilité (Lip and Li-Saw-Hee, 1998).

#### **a) Hémostase de l'hypertension**

Les études cliniques et épidémiologiques ont démontré chez des patients hypertendus une plus grande prédisposition aux phénomènes prothrombotiques associés à un état hypercoagulable évalué par une élévation des concentrations plasmatiques en fibrinogène (Cushman et al., 1996; Ishikawa et al., 1997), en facteur von Willebrand (VWF) (Blann et al., 1993), en inhibiteur de l'activateur du plasminogène ou PAI-1 (Junker et al., 1998; Landin et al., 1990; Lemmer, 1996; Phillips et al., 1993), en D-dimères (Lee et al., 1995), et de l'activité du facteur VIII (Junker et al., 1998; Phillips et al., 1993). Par ailleurs, l'augmentation de TFPI synthétisée par les CMLVs humaines en réponse à une contrainte cyclique *in vitro* montre que la pulsatilité en agissant sur la paroi interfère avec le processus de coagulation (Regnault et al., 2011). Une augmentation du taux de facteurs procoagulants comme le FVII et le fibrinogène est associée à une diminution des facteurs anticoagulants tels que l'antithrombine (AT) et la protéine C (PC) (Arikan *et al.*, 2005 (Lip and Li-Saw-Hee, 1998)).

La plupart des modèles expérimentaux d'hypertension et en particulier le modèle de rat SHR présentent ces différentes altérations.

**b) Le modèle du rat spontanément hypertendu (SHR)**

Le rat spontanément hypertendu (SHR), est l'un des modèles animal d'hypertension le plus couramment utilisé pour les études sur les maladies cardiovasculaires. Il est classiquement comparé au rat témoin normotendu « Normotendu Wistar Kyoto » (WKY),

Le rat SHR développe une hypertension spontanée vers l'âge de 6 à 8 semaines avec des pressions systoliques de l'ordre de 135 à 155 mmHg (Adams et al., 1989). Celle-ci s'accroît au cours des 12-14 semaines suivantes (McGuire and Twietmeyer, 1985).

L'hypertension du SHR, tout comme celle de l'homme, évolue avec des phases pré-hypertensives et progressives d'une durée d'au moins plusieurs semaines pour chaque phase (Folkman *et al.*, 1993).

Alors que l'hypertension est très souvent associée aux événements thrombo-emboliques, peu d'études se sont intéressées à la coagulation chez le rat SHR. Dans le plasma du rat SHR, un état hypercoagulable a déjà été observé avec des taux élevés de complexes thrombine-antithrombine (TAT) et de D-dimères associés à une augmentation de FT (Sawada et al., 2003) et une diminution de la TM (Besser et al., 2008) corrélée à une plus grande concentration plasmatique en fibrinogène et en prothrombine (Gomibuchi et al., 2007).

La prothrombine, l'AT et le TFPI ont été identifiés comme des déterminants majeurs de la génération de thrombine (Dielis et al., 2008; Nieuwenhuys et al., 2000). Dans les modèles expérimentaux d'hypertension, la contribution des CMLVs sur la génération de thrombine n'est pas connue alors que ces cellules synthétisent de manière constitutive le TFPI à des niveaux équivalents à ceux synthétisés par les CEs (Caplice et al., 1998). De plus, les CMLVs qui synthétisent des quantités importantes de FT peuvent être en contact avec le sang lors de la rupture d'une plaque d'athérome. Elles migrent dans l'intima en participant à la formation d'un thrombus qui peut compliquer l'athérosclérose (phénomène d'athérothrombose). Ce phénomène est très souvent lié à l'hypertension car celle-ci provoque des lésions au niveau de la couche interne et augmente ainsi le risque d'athérosclérose.

Classiquement, pour déterminer le rôle de l'hypertension dans un phénotype observé, un traitement anti-hypertenseur est administré au rat spontanément hypertendu. Le rat SHR est très sensible aux molécules anti-hypertensives et le Périndopril® a été largement utilisé dans les études publiées. C'est un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IEC) (Scheen and Legrand, 2003). Il inhibe la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II (AT-II) qui mène à une vasodilatation des résistances vasculaires périphériques et par conséquent à une baisse de la pression artérielle. Il est prescrit dans le cas d'HTA, de maladie coronaire stable et d'insuffisance cardiaque. Le périndopril a un effet inhibiteur sur les plaquettes et diminue le VWF plasmatique, la P-sélectine soluble, la glycoprotéine GPV, le tPA, l'EPCR ou encore le taux de fibrinogène (Remkova et al., 2008; Remkova and Kratochvilova, 2000).

## **2) Le syndrome métabolique**

Le syndrome métabolique, également appelé « syndrome X » (SMet) désigne un ensemble de signes physiologiques, morphologiques et biochimiques qui évoluent avec le temps et augmentent le risque de diabète de type 2, d'athérosclérose, de maladies cardiaques et d'accident vasculaire cérébral (AVC). Il est l'association d'une obésité centrale associée aux facteurs suivants : un taux élevé de triglycérides, un faible taux de cholestérol HDL, une hypertension, une hyperglycémie. Les chercheurs font l'hypothèse que les diverses manifestations de ce syndrome répondent à un faisceau commun de mécanismes moléculaires et cellulaires.

### **a) Hémostase et SMet**

Une forte prédisposition aux phénomènes thrombotiques est rapportée pour environ 60 % des patients obèses ou en surpoids (Eichinger et al., 2008). L'exploration de l'hémostase par un test turbimétrique qui mesure la formation, la structure et la lyse du clou formé à partir du plasma chez les patients présentant un SMet met en évidence une augmentation de la formation et structure du caillot avec le nombre de composants du SMet (Carter et al., 2007) tandis que la fibrinolyse associée à une diminution de PAI-1 est ralentie (Carter et al., 2007; Pandolfi et al., 2001; Poli et al., 2000). L'état inflammatoire favorise l'augmentation de la synthèse de facteurs procoagulants tels que le FT en activant la voie NK- $\kappa$ B (Samad et al., 2001) (Sonneberg *et al.*, 2014) ainsi que celle des facteurs FVII et VWF (Lim et al., 2004). De plus, le phénotype procoagulant se caractérise aussi par

l'augmentation de la réactivité plaquettaire et de l'émission de microparticules (Morel et al., 2006; Santilli et al., 2012).

**b) Le rat Zucker, modèle animal de syndrome métabolique**

Le rat Zucker (fa/fa) est le modèle de rat le mieux connu et le plus largement utilisé pour étudier l'obésité génétique. La mutation récessive fa a été découverte par Zucker et Zucker (Zucker and Zucker, 1963a; Zucker and Zucker, 1963b) et les animaux homozygotes pour l'allèle fa deviennent obèses entre 3 et 5 semaines d'âge, et à partir de 14 semaines ces rats sont hyperlipidémiques (Zucker and Zucker, 1963a; Zucker and Zucker, 1963b), hyperinsulinémiques (Zucker and Antoniadis, 1972), et développent une hypertrophie adipocytaire et une hyperplasie (Johnson et al., 1971).

Durant la fin des années 1960 et le début des années 1970, les rats Zucker provenaient d'une lignée originale maintenue à l'Harriet G. Bird Memorial Laboratory dans le Massachussetts. Depuis lors, ils ont été développés dans de nombreux autres laboratoires.

Les rats Zucker utilisés lors des expérimentations ont été élevés à l'animalerie de la Faculté de médecine de Nancy. Quatre groupes de rats ont été utilisés : deux groupes de rats obèses (fa/fa) comparés à des rats témoins non obèses dits « lean » ou « maigre » (FA/FA) ou (FA/fa). Contrairement aux rats non diabétiques, le récepteur à la leptine des rats Zucker (fa/fa) est tronqué en sa partie extracellulaire (Yamashita et al., 1997) ce qui conduit à une hyperlipidémie, à une résistance à l'insuline, à une hypertension et également à un état pro-thrombotique (Godbole and York, 1978). Les animaux ont été étudiés soit à 25 semaines soit à 80 semaines. Les expériences ont été réalisées en accord avec les recommandations de la communauté européenne (directives 86/609/EEC) et du comité d'éthique de l'INSERM.

## **II. Objectif de l'étude**

Notre objectif général a été de déterminer la contribution de la paroi artérielle et en particulier des CMLVs dans la génération de thrombine, et la formation d'un thrombus dans 2 pathologies vasculaires où des modifications de l'hémostase et de la paroi artérielle ont été décrites de façon indépendante : l'hypertension artérielle et le syndrome métabolique.

### **1) Génération de thrombine et thrombose artérielle dans le modèle du rat SHR**

#### **(Article 1)**

Nos objectifs spécifiques étaient de déterminer :

- 1) les modifications de génération de thrombine *in vitro* à la surface des anneaux aortiques des rats SHR en comparaison avec les anneaux de rats Wistar
- 2) le rôle de l'hypertension et des altérations de la paroi associées sur la génération de thrombine au sein de la paroi artérielle
- 3) la contribution des CMLVs dans les modifications de génération de thrombine au sein de la paroi des rats hypertendus
- 4) les conséquences de ces modifications de génération de thrombine sur la survenue de thrombose artérielle dans un modèle de thrombose carotidienne induite par du FeCl<sub>3</sub>

Pour répondre à ces questions, nous avons étudié des rats SHR âgés de 5 semaines et 12 semaines, âges qui correspondent respectivement à une période pré-hypertensive et à une hypertension bien installée. Pour confirmer le rôle de l'hypertension, nous avons également administré un traitement anti-hypertenseur (Périndopril) pendant 7 semaines entre la 5<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> semaine aux rats SHR. Nous avons utilisé des anneaux aortiques intacts, des anneaux dé-endothélialisés ou dé-adventiciés ou des anneaux composés de la media seule. Nous avons également mis en culture des CMLVs et des CE de rats Wistar et SHR et nous avons mesuré la génération de thrombine à la surface de ces cellules. Enfin, pour caractériser les conséquences de ces modifications cellulaires (CMLVs) et moléculaires (génération de thrombine) sur la survenue de thrombose, nous avons utilisé le modèle de lésion artérielle induite par le FeCl<sub>3</sub>.

## **2) Intégrine $\alpha_v\beta_3$ des CMLVs et hypercoagulabilité du rat Zucker (Article 2)**

Notre hypothèse était que le SMet conduit à des altérations au niveau structural et cellulaire qui aggravent le tableau clinique par rapport à l'HTA isolée. Pour explorer la séquence des événements conduisant à ces altérations, nous avons caractérisé le phénotype de coagulation et de fibrinolyse, ainsi que l'état vasculaire de rats Zucker adultes (25 semaines) et âgés (80 semaines) mimant le SMet humain.

Des travaux antérieurs ont mis en évidence, chez des rats SHR jeunes et adultes une surexpression des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_5\beta_1$  au niveau des structures vasculaires par rapport aux rats WKY (Bezie et al., 1998; Intengan et al., 1999). Précédemment, il a été montré au laboratoire que cette intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est impliquée aussi bien dans la rigidité artérielle (Bezie et al., 1998; Galmiche et al., 2013) que dans la génération de thrombine à la surface des CMLVs (Mao et al., 2012b).

Notre objectif était de mettre en évidence la contribution des CMLVs et de l'intégrine  $\alpha_v$  dans le phénotype prothrombotique des rats présentant un SMet.

Notre stratégie comportait plusieurs étapes :

- Dans un premier temps, nous avons mesuré la génération de thrombine *in vitro* dans les plasmas et à la surface des CMLVs mises en culture à partir d'aorte de rats obèses ou de rats « maigres ».
- En parallèle, nous avons quantifié l'intégrine  $\alpha_v$  et l'activité procoagulante des phospholipides des CMLVs.
- Dans un deuxième temps, nous avons évalué la fibrinolyse *in vitro* et l'agrégation plaquettaire en fonction de l'âge et de la présence du SMet.
- Enfin, nous avons étudié l'influence des acides gras et de l'inflammation vasculaire dans le phénotype hypercoagulable des rats obèses à 25 semaines d'âge.



### III. Articles, résultats principaux et résultats complémentaires

#### 1) Article n°1 : Vascular Smooth Muscle Cells Are Responsible for a Prothrombotic Phenotype of Spontaneously Hypertensive Rat Arteries (ATVB)

## Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



**Vascular Smooth Muscle Cells Are Responsible for a Prothrombotic Phenotype of Spontaneously Hypertensive Rat Arteries**  
Karima Ait Aissa, Jérémy Lagrange, Amel Mohamadi, Huguette Louis, Bénédicte Houppert, Pascal Challande, Denis Wahl, Patrick Lacolley and Véronique Regnault

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:930-937; originally published online February 26, 2015;

doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305377

*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2015 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/35/4/930>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2015/02/26/ATVBAHA.115.305377.DC1.html>

**Permissions:** Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the Permissions and Rights Question and Answer document.

**Reprints:** Information about reprints can be found online at:  
<http://www.lww.com/reprints>

**Subscriptions:** Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:  
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

## Vascular Smooth Muscle Cells Are Responsible for a Prothrombotic Phenotype of Spontaneously Hypertensive Rat Arteries

Karima Ait Aissa,\* Jérémy Lagrange,\* Amel Mohamadi,\* Huguette Louis, Bénédicte Houppert, Pascal Challande, Denis Wahl, Patrick Lacolley, Véronique Regnault

**Objective**—The hypothesis that hypertension induces a hypercoagulable state arises from the complications associated with hypertension: stroke and myocardial infarction. Here, we determine whether hypertension causes changes in the thrombin-generating capacity of the vascular wall.

**Approach and Results**—We used spontaneously hypertensive rats (SHR) compared with Wistar rats. The addition of thoracic aortic rings of SHR to a Wistar or SHR plasma pool resulted in a greater increase in thrombin generation compared with equivalent rings from Wistar. This increase occurred in 12- but not 5-week-old rats and was prevented by an angiotensin II–converting enzyme inhibitor, indicating that established hypertension is required to induce increased thrombin generation within the vessel wall. Whereas no difference was observed for endothelial cells, thrombin formation was higher on aortic smooth muscle cells (SMCs) from SHR than on those from Wistar. Exposure of negatively charged phospholipids was higher on SHR than on Wistar rings, as well as on cultured SMCs. Tissue factor activity was higher in SHR SMCs. Twelve-week-old SHR exhibited accelerated FeCl<sub>3</sub>-induced thrombus formation in carotid arteries, and the resulting occlusive thrombi were disaggregated by blockade of glycoprotein Iba–von Willebrand factor interactions. SHR SMCs were more sensitive to thrombin-induced proliferation than Wistar SMCs. This effect was totally abolished by a protease-activated receptor 1 inhibitor.

**Conclusions**—The prothrombotic phenotype of the SHR vessel wall was due to the ability of SMCs to support greater thrombin generation and resulted in accelerated occlusive thrombus formation after arterial injury, which was sensitive to glycoprotein Iba–von Willebrand factor inhibitors. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:930-937. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.305377.)

**Key Words:** arteries ■ rats, inbred SHR ■ smooth muscle cells ■ thrombosis

The vascular wall is one of the elements that determines the thrombotic response.<sup>1</sup> Prior studies have shed light on the ability of vascular wall cells to support tissue factor (TF)-induced thrombin generation.<sup>2-4</sup> We have recently demonstrated an increase in tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and its secretion by cultured vascular smooth muscle cells (SMCs) in response to cyclic stress.<sup>5</sup> It can be surmised that TFPI increases as vascular wall function deteriorates to compensate for a putative increase in its procoagulant potency.

It is still unclear whether hypertension causes a prothrombotic state in blood and within the vessel wall, although compelling clinical and experimental evidence points toward an impairment of the hemostatic balance in blood brought about by changes in individual coagulation factors in the presence

of elevated blood pressure. In support of a hypercoagulable state, a few clinical studies have reported higher plasma levels of clotting factor VII, fibrinogen, and fibrin D-dimers in hypertensive patients than in normotensive subjects.<sup>6-8</sup> In spontaneously hypertensive rats (SHR), in deoxycorticosterone acetate-induced hypertensive rats, and in endothelial dysfunction-induced experimental hypertension, a hypercoagulable state was demonstrated by elevated levels of thrombin-antithrombin complexes, as well as D-dimers, and supported by an increase in TF<sup>9</sup> and a decrease in thrombomodulin.<sup>10</sup> In experimental models of hypertension, the direct contribution of vascular cells to thrombin generation is not well documented. Early works focused primarily on the increased vascular expression of TF and antifibrinolytic molecules.<sup>9</sup>

Received on: July 18, 2014; final version accepted on: February 13, 2015.

From the INSERM, U1116, Vandœuvre-lès-Nancy, France (K.A.A., J.L., A.M., H.L., B.H., D.W., P.L., V.R.); Université de Lorraine, Nancy, France (K.A.A., J.L., A.M., H.L., B.H., D.W., P.L., V.R.); UPMC, University of Paris, Paris, France (P.C.); and CNRS, UMR 7190, Paris, France (P.C.).

\*These authors contributed equally to this article.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.115.305377/-/DC1>. Correspondence to Veronique Regnault, PhD, Inserm U1116, Faculté de Médecine, 9 Ave de la forêt de Haye, CS 50184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. E-mail [veronique.regnault@inserm.fr](mailto:veronique.regnault@inserm.fr)

© 2015 American Heart Association, Inc.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.305377

Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
EC	endothelial cell
ETP	endogenous thrombin potential
GPIIb $\alpha$	glycoprotein IIb $\alpha$
PAR-1	protease-activated receptor 1
SHR	spontaneously hypertensive rat
SMC	smooth muscle cell
TF	tissue factor
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
vWF	von Willebrand factor

One concern is that the function of the complex thrombin generation process is difficult to assess from estimates of its separate contributing elements. It would be preferable to estimate the overall activity of the hemostatic and thrombotic system and its relation with vascular function. This can be attempted by using a global in vitro test, such as the calibrated automated thrombogram, designed to explore the thrombin generation process under conditions as close as possible to those in vivo. This test has been shown to indicate a thrombotic tendency in several clinical settings,<sup>11–14</sup> which seems to be an independent predictor of acute ischemic stroke.<sup>15</sup>

The present study tests, in SHR, the hypothesis that changes in coagulation proteins and membrane phospholipid organization cause an increased thrombin-generating capacity within the vascular wall because SMC phenotypic modulation is a hallmark of hypertension.

### Materials and Methods

Materials and Methods are available in the online-only Data Supplement.

### Results

#### Hypertension-Associated Changes in Circulating Endothelial Markers

The weight of SHR rats was significantly lower compared with the age-matched Wistar rats (94 $\pm$ 5 versus 141 $\pm$ 2 g at 5 weeks of age and 335 $\pm$ 5 versus 441 $\pm$ 9 g at 12 weeks of age). We found that arterial blood pressure was already increased in SHR compared

with Wistar at 5 weeks of age (156 $\pm$ 9 versus 131 $\pm$ 2 mmHg,  $P=0.08$ ). This difference was more pronounced at 12 weeks of age (174 $\pm$ 1 versus 135 $\pm$ 2 mmHg,  $P<0.001$ ). Perindopril treatment reduced arterial blood pressure and weight (Table I in the online-only Data Supplement). Although SHR exhibited a smaller systolic absolute diameter of the carotid artery, the ratio of systolic diameter to weight was increased in SHR compared with Wistar rats (Table I in the online-only Data Supplement).

To assess the degree of activation of the endothelium, we have measured plasma levels of von Willebrand factor (vWF) and TFPI in both Wistar and SHR rats. We found an increase in vWF (50 $\pm$ 1% versus 34 $\pm$ 2%,  $P=0.002$ ) in 12-week-old SHR compared with age-matched Wistar. This difference was not observed in 5-week-old rats (45 $\pm$ 3% versus 43 $\pm$ 3%). TFPI was increased both in 5-week-old SHR (9.5 $\pm$ 0.8 versus 6.4 $\pm$ 0.5 U/mL,  $P=0.018$ ) and 12-week-old SHR (6.9 $\pm$ 0.2 versus 4.5 $\pm$ 0.4 U/mL,  $P=0.005$ ).

#### Aortic Rings From 12-Week-Old SHR Display Higher Thrombin-Generating Capacity Than Age-Matched Wistar Rings

When compared with 50 pmol/L TF alone (a concentration chosen to be close to levels of TF expressed by rings), addition of aortic rings from Wistar rats or SHR to a 12-week-old Wistar rat or SHR plasma pool significantly increased endogenous thrombin potential (ETP) values at 12 weeks (Figure 1B) but not at 5 weeks of age (Figure 1A). Analysis of the kinetics of thrombin formation and inactivation revealed a marked difference in peak height (Figure 1B). This procoagulant activity was significantly greater for SHR than for Wistar rings (Figure 1C). We also tested the effect of aortic rings of each animal in its own plasma and found the same increase in SHR.

To explore the contribution of SMCs, thrombin production was measured at the surface of either de-endothelialized or deadventilated rings, as well as at the surface of rings after removal of both adventitia and endothelium. Thrombin generation was significantly increased in all rings from SHR compared with Wistar rings, and this procoagulant phenotype was reversed by perindopril treatment (Figure 1D).

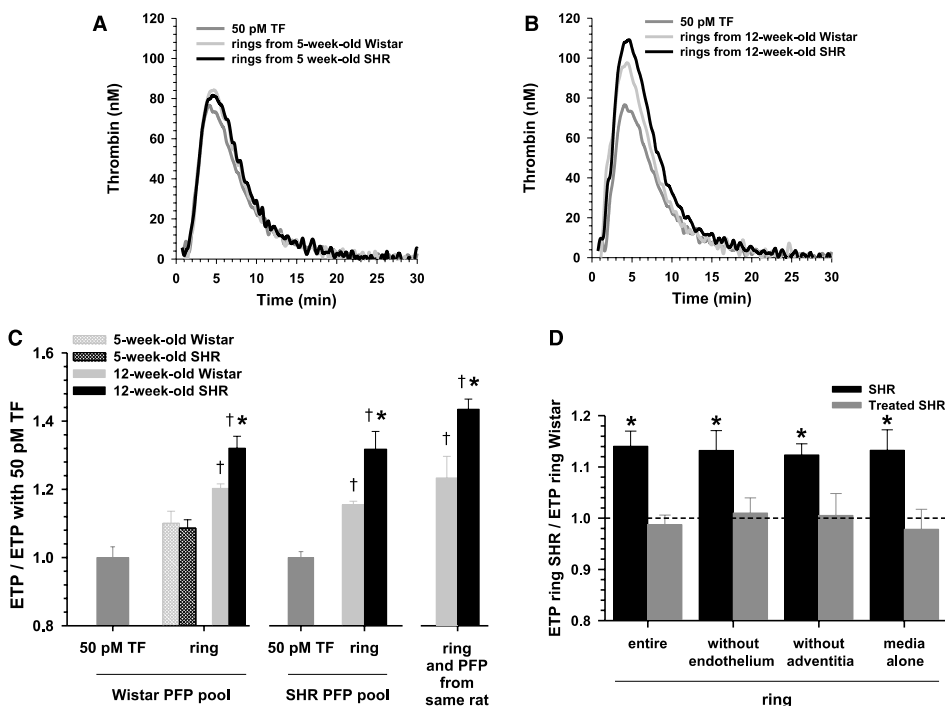
When compared with Wistar rings, the higher procoagulant phenotype of 12-week-old SHR aortic rings seemed to

Table. Vascular Levels of Hemostatic Factors

	Five-Week-Old Rats		Twelve-Week-Old Rats		
	Wistar	SHR	Wistar	SHR	Treated SHR
Aortic rings					
Tissue factor, pmoles/mg of ring	32 $\pm$ 3	29 $\pm$ 2	85 $\pm$ 9	78 $\pm$ 8	81 $\pm$ 9
TFPI, U/mg of ring	0.16 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.01	ND
PPA, nmol/L eq PS/mg of ring	159 $\pm$ 5	158 $\pm$ 5	190 $\pm$ 16	356 $\pm$ 38*	194 $\pm$ 10
Aortic smooth muscle cells					
Tissue factor, pmoles/L	6.4 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 0.2*	29 $\pm$ 2	37 $\pm$ 2*	ND
TFPI, U/mL	0.012 $\pm$ 0.001	0.012 $\pm$ 0.001	0.009 $\pm$ 0.002	0.038 $\pm$ 0.004*	ND
PPA, nmol/L eq PS/mL	418 $\pm$ 20	433 $\pm$ 15	450 $\pm$ 13	725 $\pm$ 13*	ND

Values are means $\pm$ SEM of 10 rats. ND indicates not determined; PPA, phospholipid procoagulant activity; PS, phosphatidylserine; SHR, spontaneously hypertensive rats; and TFPI, tissue factor pathway inhibitor.

\* $P<0.05$  vs Wistar at the same age.



**Figure 1.** Thrombin generation in the presence of aortic rings from Wistar rats, spontaneously hypertensive rats (SHR), or treated SHR. Representative thrombin generation curves (A and B) in a Wistar platelet-free plasma (PFP) pool triggered with 50 pmol/L tissue factor (PFP+TF) or with 2 mm rings from SHR or Wistar thoracic aortas. C, Endogenous thrombin potential (ETP) values in the presence of aortic rings added to a Wistar or SHR PFP pool or to PFP of the same rat. Results (means±SEM of 8 experiments) are normalized by the ETP value in the presence of 50 pmol/L TF. \**P*<0.05 vs Wistar; †*P*<0.05 vs PFP+TF. D, ETP values in the presence of de-endothelialized or deadventilitated rings as well as rings composed of media alone from 12-week-old rats. SHR were treated with perindopril (60 mg/L in drinking water) from 5 weeks of age, for 7 weeks. Results (means±SEM of 8 experiments) are normalized by the ETP value in the presence of control rings from Wistar rats. \**P*<0.05 vs a ratio value of 1.

be unrelated to the expression of TF or TFPI activity because SHR rings expressed similar TF and TFPI activity as Wistar rings (Table). Comparison of TF activity associated with de-endothelialized or deadventilitated rings, as well as rings constituted of media alone, revealed that this activity originated mainly from the adventitia and the media (Table II in the online-only Data Supplement). However, the exposure of negatively charged phospholipids was ≈2-fold higher on SHR than on Wistar rings, and this increase was abrogated by perindopril treatment. As expected, such differences were not observed at 5 weeks of age.

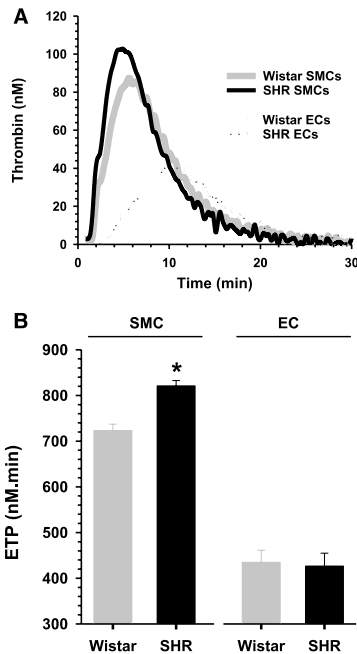
#### SMCs Are Responsible for the Procoagulant Phenotype of Aortic Rings

When compared with endothelial cells (ECs) (CD31- and vWF-positive cells), SMCs ( $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells), whatever their origin (12-week-old SHR or Wistar), displayed a greater ability to support thrombin generation. Figure 2A shows typical thrombin generation curves obtained with adherent SMCs and ECs in the presence of a Wistar platelet-free plasma pool. The times to thrombin burst and peak were significantly shortened and the peak, velocity index, and

ETP values (Figure 2B) were higher for SMCs compared with ECs. Whereas no differences were observed in the thrombin generation patterns and parameters between SHR and Wistar ECs, a higher thrombin peak and ETP were obtained with SHR SMCs compared with Wistar SMCs. Thrombin generation at the surface of SMCs from 5-week-old SHR and Wistar rats was similar (ETP values were 525±18 and 559±20 nmol/L×min, respectively).

For both 12-week-old SHR and Wistar rats, TF activity was ≈20-fold higher in SMCs compared with ECs (data not shown). SMC expression of TF and of TFPI was higher in SHR than in Wistar (Table). On the contrary, there was only a slight decrease in SMC expression of TF in 5-week-old SHR.

Measurement of phospholipid procoagulant activity revealed higher phosphatidylserine exposure on SHR than on Wistar SMCs at 12 weeks of age. We also examined the externalization of phosphatidylserine as a marker of apoptosis in SMCs using flow cytometry. Cells in early stages of apoptosis (annexin V-positive, propidium iodide-negative SMCs) were also increased in 12-week-old SHR compared with age-matched Wistar rats. These changes were not observed at 5 weeks of age.



**Figure 2.** Thrombin generation at the surfaces of spontaneously hypertensive rats (SHR) or Wistar smooth muscle cells (SMCs) and endothelial cells (ECs). Representative thrombin generation curves (A) and endogenous thrombin potential (ETP) values (B) in a Wistar platelet-free plasma (PFP) pool added to washed SMC or EC monolayers from 12-week-old rats. Results are means±SEM of 12 experiments; \* $P < 0.05$  vs Wistar.

To test whether thrombin generated at the surface of SMCs was dependent on exposure of phospholipids and endogenous TF, either a polyclonal antibody or annexin V were added to the platelet-free plasma pool. The anti-TF antibody (10  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibited  $\approx 10\%$  of thrombin generation at the surface of all SMCs tested (Figure I in the online-only Data Supplement). Annexin V, at a nonsaturating concentration (5  $\mu\text{mol/L}$ ), markedly reduced the ETP. Although similar levels of inhibition were observed with SMCs from 5-week-old rats (80%), annexin V was significantly less effective in inhibiting thrombin generation at the surface of SMCs of 12-week-old SHR compared with control Wistar SMCs (Figure I in the online-only Data Supplement).

#### Protease-Activated Receptor 1–Dependent Thrombin-Induced SMC Proliferation Is Enhanced in SHR

Protease-activated receptor 1 (PAR-1) expression (Figure 3A) and Akt phosphorylation (Figure 3B) were significantly higher in SMCs from SHR than in those from Wistar rats at 5 and 12 weeks of age. To illustrate the cellular effects of thrombin, we investigated the proliferation of SMCs in response to thrombin (0.5 U/mL) in the presence or not of the PAR-1 antagonist SCH-79797 (100 nmol/L). Thrombin-induced proliferation was higher in SHR SMCs than in those from Wistar rats, and

this difference was amplified at 12 weeks compared with 5 weeks of age (Figure 3C). Enhancement of SMC proliferation by thrombin was fully suppressed by the PAR-1 antagonist SCH-79797.

#### Hypertension-Mediated Vascular Changes Accelerate Thrombus Formation After Arterial Injury via Glycoprotein Iba–vWF Interactions

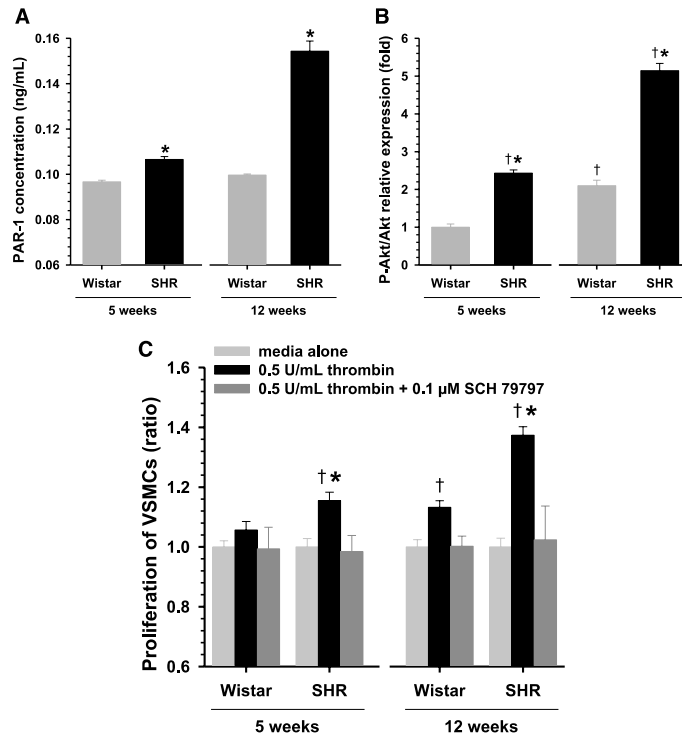
In the absence of vascular injury, 12-week-old SHR did not have higher circulating thrombin–antithrombin complex levels than Wistar rats ( $49 \pm 10$  versus  $55 \pm 13$  ng/mL) but exhibited a higher platelet count ( $527 \pm 14$  versus  $429 \pm 21 \times 10^9/L$ ,  $P = 0.012$ ) and mean platelet volume ( $7.9 \pm 0.2$  versus  $6.6 \pm 0.1$  fL,  $P = 0.005$ ) without changes in platelet function (Figure II in the online-only Data Supplement). To characterize the effect of hypertension on arterial thrombosis in vivo, we triggered thrombosis by the application of ferric chloride to the carotid artery. The mean baseline blood flow was  $520 \pm 48$  mL/min (range, 279–857 mL/min) for Wistar rats and  $436 \pm 37$  mL/min (range, 190–645 mL/min) for SHR. SHR developed stable, occlusive thrombi, whereas embolization, indicated by successive decreases and increases in blood flow, was frequently observed in Wistar rats (Figure 4A). Occlusion was reached during the 30-minute observation period for 4 of the 11 Wistar rats and in 6 of 8 SHR (Figure 4B;  $P < 0.05$ ), and the time to vessel occlusion was shorter in SHR than in Wistar rats (Figure 4C). No correlation was found between the carotid artery systolic diameter and the occlusion time. The hazard ratio for occurrence of occlusive thrombi in SHR was significantly higher: hazard ratio=4.418 (confidence interval 95%, 1.318–14.807),  $P = 0.0161$ .

To test the involvement of glycoprotein Iba (GPIba)–vWF interactions in occlusive thrombosis and the thrombolytic efficiency of GPIba–vWF inhibitors, aurintricarboxylic acid, which blocks the GPIba binding domain of vWF, was injected 15 minutes after formation of a  $\text{FeCl}_3$ -induced thrombus. Doppler flowmetry showed that aurintricarboxylic acid was effective in restoring vessel patency after occlusive thrombosis in SHR (Figure 4D). Conversely, aurintricarboxylic acid did not rescue blood flow in Wistar carotid arteries.

#### Discussion

This study demonstrates higher thrombin generation on the aortic wall because of increased procoagulant activities of SMCs from 12-week-old SHR. Our data show that established hypertension is required to induce increased thrombin generation within the vessel wall and subsequent SMC phenotypic changes. The main finding is that 12-week-old SHR exhibited accelerated  $\text{FeCl}_3$ -induced thrombus formation in carotid arteries, and the resulting occlusive thrombi could be disaggregated by blockade of GPIba–vWF interactions. Our study also highlights that hypertension-mediated SMC phenotypic modulation enhances PAR-1–dependent thrombin-induced SMC proliferation. Overall, our study extends the multifaceted pathophysiological actions of thrombin by demonstrating that enhanced thrombin formed on the surface of SMCs in hypertension increased arterial thrombosis after vascular injury and contributed to vascular remodeling.

934 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* April 2015

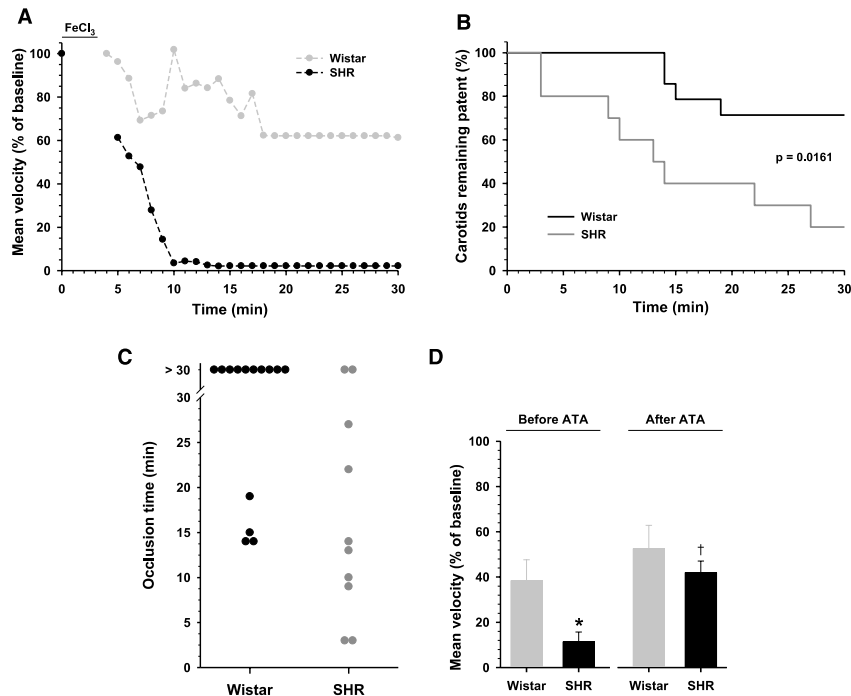


**Figure 3.** Protease-activated receptor 1 (PAR-1) expression and the effect of thrombin on smooth muscle cell (SMC) proliferation. PAR-1 expression (A) by ELISA, and phosphorylation of Akt analysis (B) by Western blotting in SMC lysates. Akt phosphorylation was quantified as the ratio of P-Akt/total Akt after normalization to  $\alpha$ -tubulin. Results are means $\pm$ SEM of 3 experiments. \* $P$ <0.05 vs SMCs from Wistar rats at the same age. † $P$ <0.05 vs SMCs from 5-week-old Wistar rats. C, SMCs were cultured in a medium without serum for 1 day before stimulation for 24 hours with 0.5 U/mL bovine thrombin in the absence or presence of 0.1  $\mu$ M SCH-79797. Results (means $\pm$ SEM of 5 experiments) are expressed as ratios of the number of cells obtained after stimulation to the number present in unstimulated wells (media alone). \* $P$ <0.05 vs SMCs from Wistar rats at the same age; † $P$ <0.05 vs media alone.

Although thrombogenesis in hypertension has been shown to be mediated by endothelial dysfunction and platelet activation, increased thrombin generation has also been reported as a potential mechanism.<sup>16,17</sup> From the hemodynamic point of view, the radial hydraulic conductance that occurs across the wall conveys soluble substances from the blood outwards.<sup>18</sup> Because most clotting factors are of low molecular weight, it is likely that they will be easily conveyed from the lumen to the medial SMCs. Endothelial activation/dysfunction also plays a major role in exposing SMCs to clotting factors. Thrombin generation can be investigated either by measuring plasma markers of in vivo activation of coagulation or by assessing the reactivity of the clotting system, taking into account the role of vascular cells. Thrombin-antithrombin complexes levels were found previously to be elevated in SHR plasma.<sup>10</sup> In the present study, thrombin-antithrombin complexes levels and thrombin generation in plasma were no higher in SHR than in Wistar, suggesting a vascular bed-specific effect in the hypertension-associated prothrombotic state. Our observation of an endothelial alteration indicated by elevated circulating levels of vWF in adult SHR compared with Wistar rats leads us to consider that vascular cells could enhance thrombin generation in SHR. To evaluate this specific contribution of the vessel wall to thrombin generation, aortic rings from SHR or Wistar were added to the same pool of plasma. We found that addition of 12-week-old SHR aortic rings to a Wistar or SHR plasma pool conferred a hypercoagulable state compared with

Wistar rings. Although adding an aortic ring to plasma cannot fully mimic the physiological interactions between plasma and the vascular wall, this result can nevertheless be attributed to the vascular cells. Such a phenotype seems to be related to established hypertension because it was not observed at 5 weeks of age and was totally prevented by antihypertensive therapy. However, we cannot exclude a predominant role of angiotensin II because it has been shown that angiotensin II-induced hypertension is associated with accelerated thrombus development in SHR and not in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension with low renin.<sup>19</sup>

Our data demonstrated that ETP values in plasma were higher when adherent SHR rather than Wistar SMCs were used as cell surfaces, whereas no difference existed for ECs, suggesting a major contribution of SMCs in the coagulation phenotype of the arterial tissue. Our findings that thrombin generation was higher in the presence of de-endothelialized or deadventilated rings or rings constituted of media alone from SHR support the conclusion that SMCs and not ECs account for the difference in thrombus development. Although it has been previously shown that SMCs have the capacity to secrete TF-enriched microparticles,<sup>20</sup> under our experimental conditions thrombin generation at the surface of SMCs was unlikely to be influenced by such microparticles, because we used washed adherent cells. In addition, we found that SMCs support higher thrombin generation than ECs as reported previously.<sup>2</sup>



**Figure 4.** Thrombus formation in Wistar or spontaneously hypertensive rats (SHR) carotid arteries. **A**, Representative Doppler profiles of the carotid blood flow after 10% FeCl<sub>3</sub> application for 3 minutes. **B**, Percentage of SHR (n=10) and Wistar rats (n=14) with patent arteries (blood flow more than 5% of the preinjury flow) as a function of time after FeCl<sub>3</sub> injury. **C**, Time to occlusion in SHR or Wistar carotids. **D**, Mean blood flow in Wistar (n=4) and SHR (n=4) carotid arteries before and after treatment, 15 minutes postocclusion, with aurintricarboxylic acid (ATA). \*P<0.05 vs Wistar rats; †P<0.05 vs SHR before ATA.

The role of cells in coagulation is primarily to provide a negatively charged phospholipid surface for assembly of all of the actors of the coagulation cascade. Exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of platelets<sup>21</sup> and vascular cells<sup>2,3</sup> regulated by a flip-flop mechanism is thought to account for the procoagulant nature of cells. Our findings showing increased amounts of phospholipid procoagulant activity in aortic rings and SMCs from SHR provide a rationale to explain increased thrombin generation in SHR related to higher SMC negatively charged phospholipids. The reduced inhibiting effect of annexin V on thrombin generation at the surface of SMCs from 12-week-old SHR supports this hypothesis. The mechanisms for the increased levels of phospholipid procoagulant activity in SMCs from adult SHR may be related to the hypertension-induced elevation of intracellular calcium<sup>22</sup> promoting the flip-flop process<sup>23</sup> and the structural reorganization of cell membranes in SHR. The preventive effect of perindopril on SMC-supported thrombin generation is thus likely to be explained by a reduction of phospholipid procoagulant activity.

Thrombin generation is initiated by TF, and the aortic layer represents a source of increased TF in hypertension.<sup>9</sup> Compared with Wistar rats, we observed in SHR higher levels of TF associated with SMCs. The high level of TF activity on adherent cultured SMCs contrasts with the low level of TFPI

activity. It is unlikely that TFPI plays a major downregulating role in thrombin generation on SMCs in either strain because TFPI is known to dampen the burst of thrombin in response to a small procoagulant stimulus.<sup>24</sup> The similar low inhibition of thrombin generation in presence of anti-TF antibodies does not argue for a major contribution of TF in the differences between SHR and Wistar rats. Because monocytes are inflammatory TF-bearing cells, macrophage infiltration in the subendothelium may contribute to the increased thrombin-generating capacity in SHR. However, such infiltration has been reported only in older SHR.<sup>25</sup> Therefore, the involvement of macrophages in the subendothelium is unlikely at 12 weeks of age.

There is increasing evidence that specific binding proteins on membranes regulate the formation of coagulation complexes by localizing coagulation factors to cell surfaces.<sup>21</sup> Increased integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression in the vessel wall of SHR has been reported previously.<sup>26</sup> We can anticipate a synergistic effect between anionic phospholipid membranes, TF, and integrin  $\alpha_v\beta_3$  on increased thrombin generation in the SHR vascular wall because this integrin is the receptor for prothrombin in SMCs<sup>27</sup> and is involved in SMC-supported thrombin generation.<sup>28</sup>

In this context, we would expect a difference in the incidence of thrombosis in Wistar and SHR and an exacerbation

of the cellular effects of thrombin. The increase in thrombin generation within the vessel wall may modulate several well-known vascular processes involved in hypertension, such as the regulation of vascular tone and the proliferation of SMCs, leading to increased pulse pressure and arterial stiffening.<sup>18,29</sup> The greater effect of thrombin on SMC proliferation in 5-week-old and 12-week-old SHR and its inhibition by SCH-79797 argue for enhanced cellular effects of thrombin contributing to vascular remodeling in hypertension. Our data indicate that the mechanism involves increased PAR-1 expression and Akt signaling pathway activation as previously reported.<sup>30</sup>

Thrombus formation in large arteries starts by platelet-platelet cross-linking involving GPIIb/IIIa receptors and GPIb $\alpha$ -vWF interactions, followed by formation of a fibrin network to anchor the platelet-rich thrombus to the vessel wall.<sup>31</sup> Fibrin formation is dependent on the exposure of procoagulant material on the SMC surface at the site of vascular injury. Most relevant to our study was the observation that hypertension-associated changes in procoagulant phospholipids at the outer surface of SMCs contributed to increased thrombin generation. The formation of occlusive thrombi and the marked shortening of the time to occlusion in SHR compared with Wistar rats suggest a critical role of increased SMC-supported thrombin generation in PAR-1-induced platelet activation and fibrin formation, both required for thrombus growth and stability. Although platelet count and PAR-1 expression were increased in SMCs from SHR, the absence of potentiated platelet function in SHR did not argue for a major contribution of PAR-1-mediated platelet activation to the differences in thrombus development between SHR and Wistar rats. Recent data have highlighted the role of GPIb $\alpha$ -vWF interactions during vessel lumen closure and revealed that disruption of these interactions restores vessel patency after occlusive thrombosis but with a limited therapeutic window.<sup>32</sup> Whereas fully occlusive thrombi in SHR were efficiently disaggregated by GPIb $\alpha$ -vWF inhibitors, nonocclusive thrombi in Wistar rats were resistant. This absence of restoration of Wistar rat vessel patency is consistent with a hierarchical process of occlusive thrombosis in which platelet-platelet cross-linking in the inner core mainly involves GPIIb/IIIa, whereas once the thrombus has occluded 50% of the artery, platelet cross-linking in the external layer occurs in a GPIb $\alpha$ -vWF-dependent manner.<sup>32,33</sup> Although it is now increasingly recognized that multiple concomitant mechanisms regulate the formation and stability of arterial thrombi, our study further points to the attractiveness of this GPIb $\alpha$ -vWF axis as a potential therapeutic target for occlusive thrombosis in the context of hypertension. Whether coadministration of an inhibitor of GPIb $\alpha$ -vWF interactions and a specific inhibitor of integrin  $\alpha_v\beta_3$  to target thrombin generation on the surface of SMCs may lead to the development of more efficient therapeutic strategies remains to be investigated.

#### Acknowledgments

We thank Mary Osborne-Pellegrin for help in editing this manuscript and the Fédération de Recherche FR3209 for assistance with flow

cytometry. We also thank Cécile Lakomy for her contribution to the cell culture studies.

#### Sources of Funding

This research project received financial support from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-09-GENO-010 and ANR-13-BSV1-0026-01), the Region Lorraine, and the Communauté Urbaine du Grand Nancy.

#### Disclosures

None.

#### References

1. Esmon CT, Esmon NL. The link between vascular features and thrombosis. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:503–514. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142300.
2. Campbell RA, Overmyer KA, Selzman CH, Sheridan BC, Wolberg AS. Contributions of extravascular and intravascular cells to fibrin network formation, structure, and stability. *Blood*. 2009;114:4886–4896. doi: 10.1182/blood-2009-06-228940.
3. Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood*. 1997;89:4378–4384.
4. Pathak A, Zhao R, Monroe DM, Roberts HR, Sheridan BC, Selzman CH, Stouffer GA. Thrombin generation in vascular tissue. *J Thromb Haemost*. 2006;4:60–67. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01630.x.
5. Regnault V, Perret-Guillaume C, Kearney-Schwartz A, Max JP, Labat C, Louis H, Wahl D, Pannier B, Lecompte T, Weryha G, Chalande P, Safar ME, Benetos A, Lacolley P. Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1226–1232. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.221911.
6. Arikian E, Sen S. Endothelial damage and hemostatic markers in patients with uncomplicated mild-to-moderate hypertension and relationship with risk factors. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2005;11:147–159.
7. Junker R, Heinrich J, Schulte H, Erren M, Assmann G. Hemostasis in normotensive and hypertensive men: results of the PROCAM study. The prospective cardiovascular Münster study. *J Hypertens*. 1998;16:917–923.
8. Lip GY, Li-Saw-Hee FL. Does hypertension confer a hypercoagulable state? *J Hypertens*. 1998;16:913–916.
9. Corseaux D, Ollivier V, Fontaine V, Huisse MG, Philippe M, Louedec L, Vranckx R, Ravanat C, Lanza F, Angles-Cano E, Guillin MC, Michel JB. Hemostasis imbalance in experimental hypertension. *Mol Med*. 2002;8:169–178.
10. Sawada K, Naiki M, Yago H, Matsushita K, Ohtsuki T, Kitagawa K, Matsumoto M, Hori M. Hypertension associated with reduced plasma thrombomodulin levels and a hypercoagulable state in rats. *Clin Exp Hypertens*. 2003;25:73–84.
11. Besser M, Baglin C, Luddington R, van Hylckama Vlieg A, Baglin T. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *J Thromb Haemost*. 2008;6:1720–1725. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03117.x.
12. Dargaud Y, Trzeciak MC, Bordet JC, Ninet J, Negrier C. Use of calibrated automated thrombinography +/- thrombomodulin to recognise the prothrombotic phenotype. *Thromb Haemost*. 2006;96:562–567.
13. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA*. 2006;296:397–402. doi: 10.1001/jama.296.4.397.
14. Lecompte T, Wahl D, Perret-Guillaume C, Hemker HC, Lacolley P, Regnault V. Hypercoagulability resulting from opposite effects of lupus anticoagulants is associated strongly with thrombotic risk. *Haematologica*. 2007;92:714–715.
15. Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, Spaft C, Ducimetière P, Ritchie K, Dartigues JF, Scarabin PY. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1445–1451. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.223453.
16. Senchenkova EY, Russell J, Esmon CT, Granger DN. Roles of coagulation and fibrinolysis in angiotensin II enhanced microvascular thrombosis. *Microcirculation*. 2014; 21:401–407.



- van den Born BJ, Löwenberg EC, van der Hoeven NV, de Laat B, Meijers JC, Levi M, van Montfrans GA. Endothelial dysfunction, platelet activation, thrombogenesis and fibrinolysis in patients with hypertensive crisis. *J Hypertens*. 2011;29:922–927. doi: 10.1097/HJH.0b013e328345023d.
- Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res*. 2012;95:194–204. doi: 10.1093/cvr/cvs135.
- Senchenkova EY, Russell J, Kurmaeva E, Ostanin D, Granger DN. Role of T lymphocytes in angiotensin II-mediated microvascular thrombosis. *Hypertension*. 2011;58:959–965. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.173856.
- Schechter AD, Spirn B, Rossikhina M, Giesen PL, Bogdanov V, Fallon JT, Fisher EA, Schnapp LM, Nemerson Y, Taubman MB. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000;87:126–132.
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1381–1389.
- Touyz RM, El Mabrouk M, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1999;84:505–515.
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:15–26. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.200956.
- Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:233–242. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.141606.
- Clozel M, Kuhn H, Hefti F, Baumgartner HR. Endothelial dysfunction and subendothelial monocyte macrophages in hypertension. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *Hypertension*. 1991;18:132–141.
- Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation*. 1999;100:2267–2275.
- Stouffer GA, Smyth SS. Effects of thrombin on interactions between beta3-integrins and extracellular matrix in platelets and vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1971–1978. doi: 10.1161/01.ATV.0000093470.51580.0F.
- Mao X, Said R, Louis H, Max JP, Bourhim M, Challande P, Wahl D, Li Z, Regnault V, Lacolley P. Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin  $\alpha v \beta 3$  pathway. *Cardiovasc Res*. 2012;96:513–523. doi: 10.1093/cvr/cvs274.
- Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res*. 2009;82:392–403. doi: 10.1093/cvr/cvp066.
- Mahajan SG, Fender AC, Meyer-Kirchath J, Kurt M, Barth M, Sagban TA, Fischer JW, Schrör K, Hohlfeld T, Rauch BH. A novel function of FoxO transcription factors in thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Thromb Haemost*. 2012;108:148–158. doi: 10.1160/TH11-11-0756.
- Jackson SP. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011;17:1423–1436. doi: 10.1038/nm.2515.
- Le Behot A, Gauberti M, Martinez De Lizarrondo S, Montagne A, Lemarchand E, Repesse Y, Guillou S, Denis CV, Maubert E, Orset C, Vivien D. Gplb $\alpha$ -VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice. *Blood*. 2014;123:3354–3363. doi: 10.1182/blood-2013-12-543074.
- Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, Voronov R, Diamond SL, Brass LF. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood*. 2013;121:1875–1885. doi: 10.1182/blood-2012-09-457739.

### Significance

Smooth muscle cell plasticity is a hallmark of hypertension, and pulsatile hemodynamics play a crucial role in the production and secretion of procoagulant and anticoagulant factors by vascular smooth muscle cells. Our findings demonstrate that established hypertension induced increased thrombin generation on the surface of vascular smooth muscle cells by promoting negatively charged phospholipid exposure and increasing synthesis of tissue factor. This results in a prothrombotic phenotype of the arterial tissue in adult spontaneously hypertensive rats resulting in accelerated occlusive thrombus formation after arterial injury. Restoration of vessel patency by blockade of glycoprotein Ib $\alpha$ -von Willebrand factor interactions supports the potential beneficial effect of such inhibitors in occlusive thrombosis. Hypertension-mediated thrombin generation within the vessel wall may also exert proliferative effects on smooth muscle cells which involve the protease-activated receptor 1.

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

Ait Aissa et al.

### **Material and methods**

#### ***Animals***

Five week-old and 12 week-old, male spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar rats were obtained from Charles River (France). All of the experiments complied with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals by the National Institutes of Health and all procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Systolic blood pressure was measured using a tailcuff blood pressure analyzer (Blood Pressure Analysis System, model SC-1000; Hatteras Instruments, Cary, NC) on conscious animals. Systolic diameter and thickness of the right common carotid artery were measured by echography using a Vevo 770 High-Resolution Imaging Systems (VisualSonics Inc., Amsterdam, The Netherlands). A group of 8 SHR rats were treated with the angiotensin II-converting enzyme inhibitor, perindopril, in the drinking water (60 mg/L) from 5 weeks of age for 7 weeks.

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

The descending thoracic aorta was excised from rats after isoflurane anesthesia (4.5% in 1.5 L/min dioxygen) and exsanguination. Two-millimeter ring segments were prepared from a first set of 18 Wistar rats, 18 SHR and 8 treated SHR and washed for 1 h at 4°C with 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7.35 containing 5 g/L albumin (HBS) and then used for thrombin generation assays or phospholipid procoagulant activity. Aortic smooth muscle cells (SMCs) and endothelial cells (ECs) were isolated from a second set of 8 SHR and 8 Wistar rats at each age as previously described.<sup>1</sup> SMCs were grown in DMEM/F12 supplemented with 10% foetal bovine serum and ECs in Clonetics® EGM®-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% horse serum. For thrombin generation assays, SMCs at passages 3-5 or ECs at passage 2 were seeded (7500 cells/well) in 96-well tissue culture flat-bottom plates (MICROTEST™96), grown to subconfluence and washed with HBS before use.

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

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

#### ***Hematologic analyses***

Complete blood counts and haematocrit were determined with an automatic cell counter (Micros 60 ABX model, Montpellier, France). Circulating von Willebrand factor (vWF) antigen

was measured by ELISA (Asserachrom®, Diagnostica Stago, Asnières, France). Each plasma sample was assayed at two different dilutions chosen in order to interpolate results, expressed as percentages, using the calibration curve obtained with the human calibrator supplied within the kit. Thrombin-antithrombin complexes were measured with the Enzygnost® TAT micro ELISA kit (Instrumentation Laboratory, Paris, France). Tissue factor (TF) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) activities were measured in 200 µL HBS incubated for 1 h at room temperature with aortic rings using the Actichrome® tissue factor and Actichrome® TFPI activity assay respectively (American Diagnostica, Stamford, CT). To measure cell surface TF or TFPI activity, washed adherent SMCs or ECs were overlaid with 75 and 20 µL of HBS respectively. The reaction was stopped with 50 µL of glacial acetic acid and the absorbance was read at 405 nm. Protease-activated receptor 1 expression was measured by an ELISA kit (USCN Life Sciences, Wuhan, China) in SMC proteins obtained by lysing SMCs in complete Lysis-M buffer (Roche Diagnostics Corporation, Basel, Switzerland). An amount of 20 µg of total proteins was added to each well.

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

Calibrated automated thrombography was performed at 37°C in a microtiter plate fluorometer (Fluoroskan Ascent, ThermoLabsystems, Helsinki, Finland) using a dedicated software program (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands) as reported previously.<sup>2,3</sup> Thrombin generation was triggered by recalcification in the presence of recombinant human TF (Dade Behring, Marburg, Germany). Round-bottom 96-well Greiner blue plates were used for PFP in which aortic rings had been added, and MICROTTEST™96 plates for SMC or EC monolayers. Thrombin generation curves were recorded in triplicate and the endogenous thrombin potential (ETP) was assessed as the area under the curve.

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

The chromogenic assay measuring the phospholipid-related procoagulant activity (PPA) in aortic rings was performed as described previously for plasma.<sup>4,5</sup> Rings resuspended in 50 µL of 50 mM Tris, 175 mM NaCl, pH 7.9 (TBS) containing 2 g/L bovine serum albumin (BSA) were added to wells containing 50 µL of activated factor X (FXa) (1.2 nM), activated factor V (FVa) (2.4 nM), CaCl<sub>2</sub> (15 mM) and 50 µL of bovine prothrombin (6 µM) plus S2238 substrate (0.6 mM). The absorbance change was read at 405 nm at 37°C. For SMC monolayers, washed adherent cells were incubated with 50 µL of TBS-BSA, 50 µL of FXa-FVa-CaCl<sub>2</sub> and 50 µL of bovine prothrombin (6 µM) plus Z-Gly-Gly-Arg-AMC substrate (1.25 mM) in 20 mM HEPES pH 7.5 containing 60 g/L BSA. The plate was placed in the Fluoroskan Ascent fluorometer and allowed to warm to 37°C for 5 min before kinetic readings were taken over 10 min. Phospholipid concentration was estimated from the initial rate of thrombin formation by reference to a standard curve constructed with a mixture of phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) (20:20:60 mole%), and expressed as PS equivalents.

### ***Washed platelet preparation***

Whole blood was collected via a carotid catheter into syringes containing one-sixth the volume of an acid-citrate dextrose solution. Blood was centrifuged at 190g for 4 min followed by 70 seconds at 1900g at room temperature to obtain PRP and then platelets were

sedimented by centrifugation at 5000g for 4 min. Platelets were resuspended at a final concentration of  $2 \times 10^8$ /mL in Tyrode buffer (5 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 mM glucose, pH 7.3).

### ***Platelet aggregation***

Platelet aggregation was measured by turbidimetry at 37°C under stirring conditions in presence of 1.27 mg/mL exogenous rat fibrinogen. Washed platelets ( $2 \times 10^8$ /mL) were stimulated by 5 µg/mL collagen (SD Innovation, Frouard, France) or 10 µM ADP (SD Innovation) or 10 nM thrombin (Diamed), and aggregation was monitored for 10 min using a TA-8V aggregometer (SD Innovation).

### ***Flow cytometry***

Washed platelets ( $2 \times 10^8$ /mL) were incubated with increasing concentrations of collagen or thrombin for 15 min at 37°C. Non-stimulated and stimulated platelets (5 µL) were incubated with a Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-P-selectin antibody (Santa Cruz) in a final volume of 50 µL PBS. Phosphatidylserine exposure was quantified by annexin V labelling using (FITC)-coupled annexin V (Beckman Coulter, Villepinte, France). Samples were analysed using a Gallios flow-cytometer (Beckman Coulter).

Apoptosis was examined by a double staining method using the fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labelled annexin V/propidium iodide (PI) apoptosis detection kit (Beckman Coulter) according to the manufacturer's instructions. Briefly, trypsinized SMCs were washed twice with PBS, and stained with FITC-conjugated annexin V and PI dyes. The externalization of PS and the permeability to PI were evaluated by flow cytometry on a Gallios flow-cytometer. Data from 10,000 events per sample were collected. Cells in early stages of apoptosis were positively stained only with annexin V.

### ***Western blotting***

Proteins were obtained by lysing SMCs in complete Lysis-M buffer (Roche Diagnostics Corporation, Basel, Switzerland). Lysates were subjected to SDS\_PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and incubated with antibodies against  $\alpha$ -tubulin (Sigma), Akt, and phosphorylated-Akt (Cell Signalling, Danvers, MA). Immune complexes were detected with appropriate secondary antibodies and enhanced chemiluminescence reagent (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

### ***Cell proliferation assay***

SMCs were seeded at a density of  $10^4$  cells/well in 24-well plates. At 60-80% confluence, cells were washed with PBS and then starved for 24 h in DMEM/F12 without serum. Medium was then replaced with fresh serum-free DMEM/F12 containing 0.5 U/mL bovine thrombin (Synapse B.V., Maastricht, The Netherlands), with or without the protease-activated receptor 1-selective antagonist SCH-79797 (100 nM) for 24 h. The 0.5 U/mL concentration represented half of the level required for clot formation (1 U/mL) and was thus selected to mainly elicit the mitogenic effect of thrombin. Cells were counted after trypsinization in a Scepter® 2.0 Handheld Automated Cell Counter (Merck Millipore, Molsheim, France).

### ***Ferric chloride-induced carotid artery thrombosis model***

Rats were anesthetized with 2% isoflurane in 0.5 L/min oxygen and the right common carotid artery was exposed by blunt dissection. A 5 × 10 mm filter paper soaked in freshly prepared 10% ferric chloride (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) was applied to the surface of the adventitia of the exposed artery for 3 minutes. After removal of the filter paper, the artery was washed with 0.9% NaCl and blood flow was monitored for 30 min via Doppler transonic flow probe (RMV707B, 15-45 MHz, FUJIFILM Visualsonics Inc, Amsterdam, The Netherlands). Occlusion time was defined as the time between FeCl<sub>3</sub> application and blood flow decrease to less than 20 mL/min<sup>-1</sup> for more than 1 min.

To study the role of glycoprotein (GP)Ib $\alpha$ -vWF interactions, some rats were injected intravenously with aurointricarboxylic acid (ATA, 20 mg/kg; Sigma-Aldrich), a polycarboxylated compound which binds to the A1 domain of vWF, thus preventing binding of vWF to platelet GPIb $\alpha$ . ATA was injected as a rapid bolus 15 min after occlusive thrombosis.

### ***Statistical analysis***

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Comparisons between groups at the same age were performed using the Wilcoxon rank test. The percentages of rats with patent arteries in each group are plotted in a Kaplan–Meier graph as a function of time after initiation of FeCl<sub>3</sub> injury. A Cox proportional hazard model was used to compare groups. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

### ***References for methods***

1. Battle T, Arnal JF, Challah M, Michel JB. Selective isolation of rat aortic wall layers and their cell types in culture—application to converting enzyme activity measurement. *Tissue Cell*. 1994;26:943-955.
2. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Beguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:4-15.
3. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography—potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res*. 2004;114:539-545.
4. Membre A, Wahl D, Latger-Cannard V, Max JP, Lacolley P, Lecompte T, Regnault V. The effect of platelet activation on the hypercoagulability induced by murine monoclonal antiphospholipid antibodies. *Haematologica*. 2008;93:566-573.
5. Wagenvoord RJ, Hendrix HH, Kai H, Hemker HC. A chromogenic test to determine the procoagulant phospholipids in platelet-rich plasma and whole blood. *Thromb Haemost*. 1994;72:582-587.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Table I: Vascular parameters

	Wistar	SHR	Treated SHR
Number	15	15	8
Weight (g)	441 ± 9	335 ± 5 *	284 ± 5 **
Conscious SBP (mmHg)	135 ± 2	174 ± 1 *	117 ± 3 **
Systolic CA thickness (µm)	179 ± 9	181 ± 7	161 ± 10
Systolic CA diameter (µm)	1141 ± 21	968 ± 28 *	835 ± 75 **
Systolic CA diameter/weight (µm/g)	2.60 ± 0.06	2.91 ± 0.11 *	2.96 ± 0.29

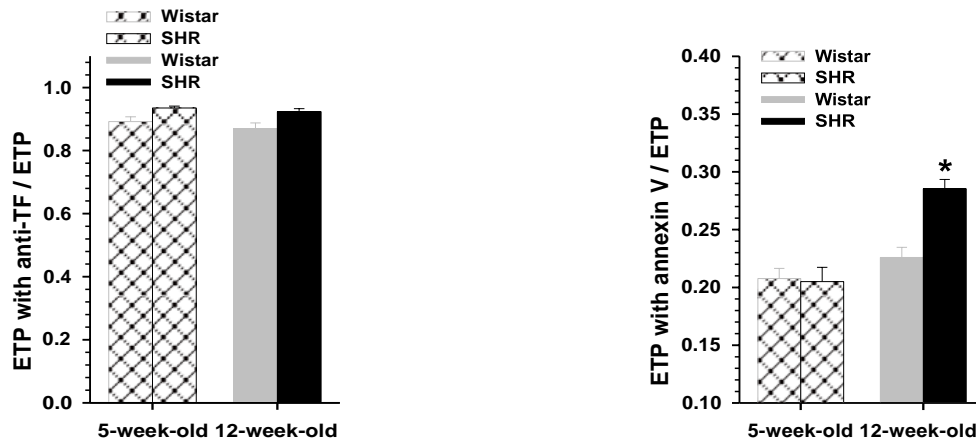
SBP, systolic blood pressure, CA, carotid artery.

Values are means ± SEM. \*  $P < 0.05$  vs Wistar. #  $P < 0.05$  vs SHR.

**Supplemental Table II:** Tissue factor activity associated with de-endothelialized or deadventitiated rings or rings constituted of media alone

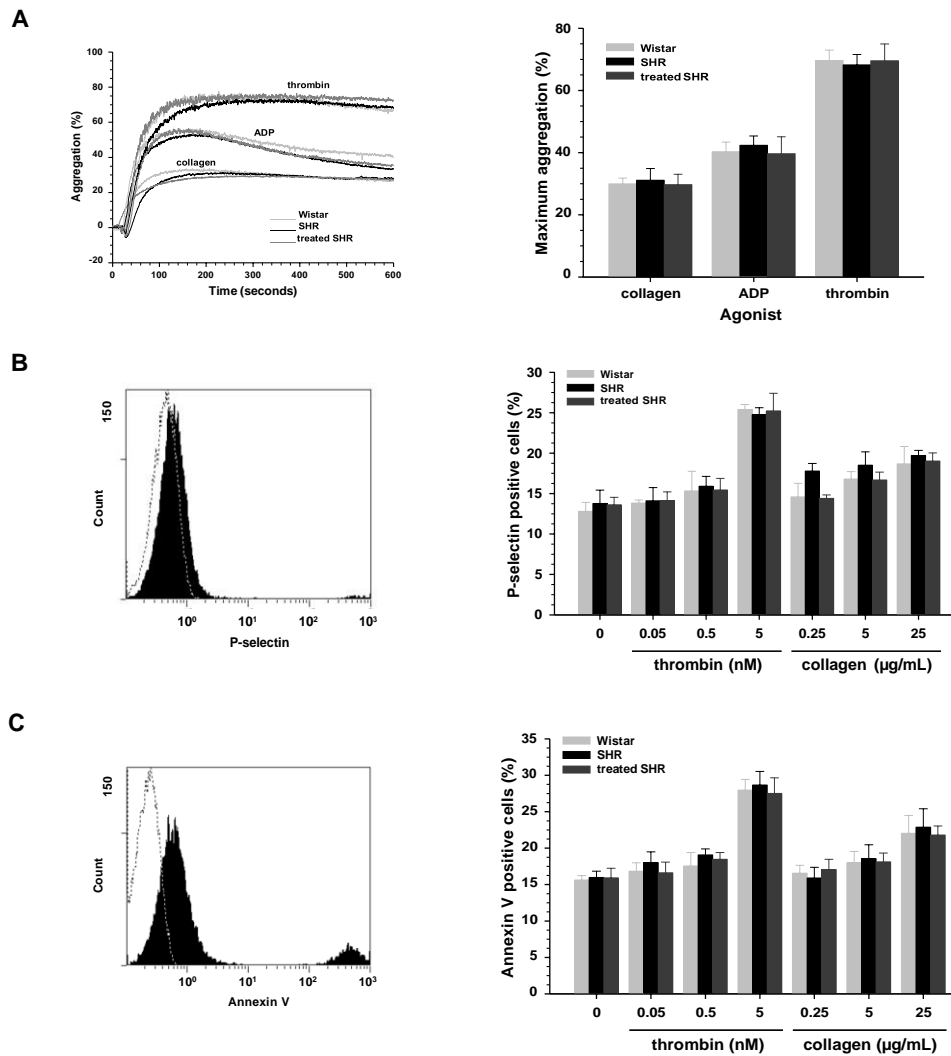
Rat strain	% of tissue factor activity in entire ring	
	Wistar (n=6)	SHR (n=6)
De-endothelialized rings	97 ± 10	94 ± 14
De-adventitiated rings	19 ± 3	19 ± 3
Rings constituted of media alone	18 ± 2	19 ± 2

Values are means ± SEM.



**Figure I.** Effect of a polyclonal anti-tissue factor antibody or annexin V on thrombin generation at the surface of SMCs. The antibody (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), or annexin V (5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), was added prior to the addition of 16.7 mM  $\text{CaCl}_2$ . Results are expressed as the ratio between values in the presence and those in the absence of anti-tissue factor antibody (left panel) or annexin V (right panel). Data represent means  $\pm$  SEM of SMC cultures from 3 different rats, tested in triplicate. \*  $P < 0.05$  vs Wistar at the same age.





**Figure II. Platelet function in SHR and Wistar rat. (A)** Representative aggregation tracings and mean maximum aggregation in response to various agonists (5 µg/mL collagen, 10 µM ADP and 10 nM thrombin) in the presence of 1.27 mg/mL fibrinogen. **(B)** Representative flow cytometry histograms and mean annexin V binding to non-stimulated washed platelets or washed platelets incubated with various concentrations of thrombin or collagen. **(C)** Representative flow cytometry histograms and mean percentages of P-selectin-positive cells of non-stimulated washed platelets or washed platelets incubated with various concentrations of thrombin or collagen. Results are presented as means ± SEM (n=11 for Wistar rats and SHR and n=8 for treated SHR)

2) Article 2, Free fatty acids increase thrombin generation and decreases  
fibrinolysis (en cours de soumission)

**Free fatty acids increase thrombin generation and decrease  
fibrinolysis enhancing vascular inflammation in aged Zucker rats**

Jérémy Lagrange<sup>1,2</sup>, Amel Mohamadi<sup>1,2</sup>, Melusine Didelot<sup>1,2</sup>, Lucy A. Walton<sup>3</sup>, Saartje Bloemen<sup>4</sup>, Bas de Laat<sup>4</sup>, Huguette Louis<sup>1,2</sup>, Simon N. Thornton<sup>1,2</sup>, Brian Derby<sup>5</sup>, Bruno Fève<sup>6,7,8</sup>, Riaz Akhtar<sup>10</sup>, J. Kennedy Cruickshank<sup>11</sup>, Patrick Lacolley<sup>1,2,9\*</sup> Véronique Regnault<sup>1,2,9\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM, U1116, Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

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

<sup>3</sup> Institute of Cardiovascular Sciences, Faculty of Medical and Human Sciences, The University of Manchester, UK.

<sup>4</sup> Synapse BV, Maastricht University, Maastricht, NL.

<sup>5</sup> School of Materials, The University of Manchester, Manchester, UK.

<sup>6</sup> Centre de Recherche Saint-Antoine INSERM-Université Pierre et Marie Curie, UMR\_S938, U938, Paris, France.

<sup>7</sup> Institut Hospitalo-Universitaire ICAN, Paris, France.

<sup>8</sup> Assistance-Publique des Hôpitaux de Paris, Service d'Endocrinologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France.

<sup>9</sup> CHU Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

<sup>10</sup> Centre for Materials and Structures, School of Engineering, University of Liverpool, UK.

<sup>11</sup> Diabetes & Cardiovascular Medicine, Nutritional Sciences Division, King's College London, Franklin Wilkins Building, London, UK.

\* These authors contributed equally to this work.

**Short title:** Fatty acids in thrombin generation and vascular inflammation

Text: 5012 words

Abstract: 436 words

Tables and Figures: 1 table and 4 figures

Corresponding author : Veronique Regnault, Inserm U1116, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel 33 3 83683470, Fax 33 3 83683639; mail: [veronique.regnault@inserm.fr](mailto:veronique.regnault@inserm.fr)

**Summary.** *Background:* The metabolic syndrome (MetS) and aging are associated with modifications in blood coagulation factors, vascular inflammation, and increased risk of thrombosis. *Objectives:* Our aim was to evaluate the impact of obesity MetS and aging on the potential causative mechanisms (adipokines, free fatty acids, cytokine expression and protease activity) and functional consequences in the vascular phenotype in “adult” and “old” Zucker rats that share some features of the human MetS. *Methods:* Cytokine array, *in situ* gelatin zymography, calibrated automated thrombography (CAT), platelet aggregation and fibrinolytic tests were performed in 25 and 80 week-old lean and obese Zucker rats. Vascular smooth muscle cells (VSMCs) from 25 week-old lean and obese Zucker rats were cultured and then CAT assay and western blots were performed. *Results:* Platelet count was increased in obese rats at both ages and ADP triggered platelet aggregation was increased in aged obese and lean rats. Endogenous thrombin potential (ETP) was higher in 25 week-old obese rats than in same aged lean rats ( $549\pm 52$  versus  $395\pm 37$  nM.min,  $p<0.05$ ) and still higher at 80 weeks ( $553\pm 76$  versus  $362\pm 34$  nM.min,  $p<0.05$ ). Fibrin fibers were thinner in obese rats indicating accelerated clot formation. The fibrinolytic test showed an increased half-lysis time with obesity and age. Addition of physiological concentrations of adiponectin downregulated thrombin generation, while leptin at pharmacological concentrations and fibrinogen dose-dependently increased

ETP. Addition of physiological concentrations of palmitic acid, but not linoleic acid, increased ETP. Thrombin generation modification by these MetS related molecules suggests a prominent role of these latter molecules in obese rats. Proinflammatory cytokines were increased with obesity or with age in the same way as fibrinogen, one of the pivotal molecules of haemostasis. ETP was increase at the surface of VSMCs from obese and/or aged rats which is in favor of an overall procoagulant state of the vascular wall and was increased with palmitic acid. Obese Zucker rat VSMCs displayed also increased  $\alpha_v$  integrin subunit and decreased VSMCs differentiation proteins. Finally, gelatinase activity, indicative of metalloproteinase activity, was increased in the vascular wall of obese rats and with aging in both strains while obese VSMCs expression of metalloproteinase 2 was increased. *Conclusions:* We have shown that early hypercoagulability in obese rats in a state of systemic inflammation is related to free fatty acids and vascular inflammation. This phenotype is amplified by increased platelet aggregation, thrombin generation and faster fibrin fiber formation, and decreased fibrinolysis with age. We have shown for the first time that saturated fatty acids and other MetS related molecules directly impaired thrombin generation and participated to increase thrombotic risk and VSMCs alteration in MetS and with age.

**Keywords:** aging, blood coagulation test, obesity.

## **Introduction**

Atherothrombotic events and venous thromboembolism are associated with the metabolic syndrome (MetS), a cluster of risk factors for cardiovascular disease including insulin resistance (IR), abdominal adiposity, dyslipidemia, and hypertension (1,2). Likewise, obesity is causally related to the high prevalence of MetS. Inflammation in MetS results in endothelial dysfunction and increased arterial stiffness (3), probably through the action of matrix metalloproteinases (MMPs) (4). Aging is also associated with intimal thickening, breaks in the internal elastic lamina and impaired endothelial function leading to increased arterial stiffness (5,6).

A further cascade of obesity-induced chronic inflammation leads to increased tissue factor (TF) (7) through the NF- $\kappa$ B pathway (8). Increased levels of factor VII, which in the activated form has long been known as a predictor of coronary events (9–11), and von Willebrand factor participate in the prothrombotic state found in MetS. Total thrombin generation and platelet reactivity are increased in type 2 diabetes and older obese women (12,13). Furthermore, as far as fibrinolysis is concerned, chronic inflammation, abdominal obesity, and IR all increase plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) production, so reducing plasminogen conversion and leading to a hypofibrinolytic state (14–17).

Adipokines (adiponectin, leptin) as well as free fatty acid metabolism are deeply changed in MetS (18,19). Both are known to be directly or indirectly implicated in haemostasis and increased thrombosis (20–22). Since haemostasis is modified in the MetS and during aging our hypothesis is that MetS and the related adipokines and free fatty acids have major impacts on haemostasis changes and increase thrombotic risk and worsen the vascular phenotype. A major

challenge is to elucidate the mechanisms leading to increased thrombosis during MetS and in the natural course of aging, and how they are related to the interaction between blood haemostasis and the vascular wall. Rodent models that mimic human MetS are major tools for understanding this pathophysiology (23).

Obese Zucker rats have a missense point mutation (fa/fa) in the leptin receptor gene that leads to hyperphagia and marked obesity (24). These rats display also many other aspects of the human condition, such as IR, hypertension, and increased plasma lipid levels (25). We have previously shown that obese Zucker rats exhibited, an increased age-dependent arterial stiffening, which was greater in obese than lean, and an endothelial dysfunction with increased systemic oxidative stress (23).

Our aim was to evaluate the impact of obesity on the potential causative mechanisms (adipokins, free fatty acids, cytokine expression and protease activity) and functional consequences (micro-mechanical stiffening) of vascular remodeling in “adult” (25-week-old) and “old” (80-week-old) Zucker rats with MetS characteristics and their lean littermates. Furthermore, we have investigated how disturbances of haemostasis occurring in the MetS and with age affected the arterial wall.

## **Materials and methods**

### ***Animals***

Male Zucker rats with the MetS (MSZR, fa/fa;  $n = 18$ ) and their age-matched male lean Zucker rat controls (LZR, FA/-;  $n = 18$ ) were obtained from the breeding colony (animal facility, Faculty of Medicine, University of Lorraine, France). The animals were maintained at a constant temperature of 22-24 °C, with a 12 h light-dark cycle (light beginning at 8 A.M) and given free access to water and chow (A04 standards, Scientific Animal Food and Engineering advance, Augy, France). The metabolic status of MSZR and LZR has been published previously (23).

Eighty weeks of age corresponds to 5 weeks before the mean maximum life span of rats from our local breeding colony. The experiments and all procedures were conducted in accordance with and approved by the Animal Ethics Committee of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the National Institutes of Health.

### ***Blood sampling***

Rats were anesthetized with isoflurane and whole blood was collected via a carotid catheter into syringes containing one-tenth the volume of 0.106 M sodium citrate. Platelet count was determined with an automatic cell counter (Micros 60 ABX model, Montpellier, France). Blood was centrifuged at 190g for 10 min at room temperature to obtain platelet-rich plasma (PRP) and then at 1750g for 10 min to obtain platelet-poor plasma. PRP was adjusted to  $200 \times 10^9$  platelets/l

by addition of autologous platelet-poor plasma and used for platelet aggregation and thrombin generation. Platelet-free plasma (PFP) was obtained by centrifugation of platelet-poor plasma at 13000g for 30 min at 4°C, and frozen at -80°C.

### ***Preparation of Arterial Cryo-Sections***

Artery cryo-sections were collected in the cross-sectional orientation and subsequently used for *in situ* gelatin zymography. The descending thoracic aorta was embedded in Optimal Cutting Temperature (OCT) medium and frozen using iso-pentane pre-cooled in liquid N<sub>2</sub> and stored at -80°C until cryo-sectioning. Cryo-sections were cut at a thickness of 5 µm and mounted onto glass slides (Leica, Milton Keynes, UK) and stored at -80 °C until use.

### ***Platelet aggregation***

Blood was centrifuged at 190g for 4 min followed by 70 seconds at 1900g at room temperature to obtain PRP and then platelets were sedimented by centrifugation at 5000g for 4 min. Platelets were re-suspended at a final concentration of  $2 \times 10^8$ /ml in Tyrode buffer (5 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 mM glucose, pH 7.3). Platelet aggregation was measured by turbidimetry at 37°C under stirred conditions. PRP or washed platelets were adjusted to  $200 \times 10^9$  platelets/l. Washed platelets were stimulated by 5 µg/ml collagen (SD Innovation, Frouard, France) and PRP with 5 µM ADP (SD Innovation) and aggregation was followed for 10 min using a TA-8V aggregometer (SD Innovation).



### ***Thrombin generation assay***

Calibrated automated thrombography (CAT) in PFP was performed in a microtiter plate fluorometer (Fluoroskan Ascent, ThermoLabsystems, Helsinki, Finland) using a dedicated software program (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands) as reported previously (26, 27). Coagulation was triggered by 5 pM recombinant human tissue factor (TF) (Dade Behring, Marburg, Germany). All reagents were used at half the ordinary volume as follows: 40 µl PFP, 10 µl TF and phospholipid vesicles (PV) consisted of phosphatidylcholine,-serine-ethanolamine (PC/PS/PE) 60/20/20 mole% 4 µM equivalent PS and 10 µl fluorogenic substrate and calcium. PV were replaced by buffer in PRP and cell experiments. Round-bottom 96-well Greiner blue plates were used for PFP and PRP, and MICROTTEST™96 plates for VSMC monolayers. Thrombin generation curves were recorded in triplicate. Thrombin generation was monitored also following supplementing of the plasma from 25 week-old LZR with adiponectin or leptin (BioVision, San Francisco, USA), with fibrinogen (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), palmitic acid or linoleic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

### ***Coagulation Parameters***

Prothrombin was measured in PFP samples diluted 1:40-80 in factor diluent (Instrumentation Laboratory, Le Pré Saint Gervais, France). For each assay 50 µl of diluted sample were added to 50µl of human prothrombin-deficient plasma (Siemens Healthcare Diagnostics SAS, Saint-Denis, France). After 1 min of incubation at 37°C in a KC10 coagulometer, coagulation was started by addition of 80µl of Thromborel® S. Calibration curves were generated using the reference plasma Unicalibrator (Diagnostica Stago, Asnières, France). Fibrinogen was

measured in PFP samples diluted 1:10-20 in Owren-Koller buffer (Diagnostica Stago, Asnières, France). Unicalibrator was used to generate calibration curves. After 4 min of incubation at 37°C in a KC10 coagulometer, coagulation was started by addition of 100 µl of Fibriquik (Biomérieux-Trinity Biotech, Bray, Ireland). Antithrombin levels were measured with the Coamatic® antithrombin test kit from Chromogenix, and TAT with the Enzygnost® TAT micro (Instrumentation Laboratory). TF and TF pathway inhibitor (TFPI) activities were measured in PFP, and in 200 µl HBS incubated for 1 h at room temperature with aortic rings using the Actichrome® tissue factor and Actichrome® TFPI activity assay respectively (American Diagnostica, Stamford, CT). The reaction was stopped with 50 µl of glacial acetic acid and the absorbance was read at 405 nm.

### ***In vitro fibrinolytic test***

PFP (20 µl) was diluted by addition of 40 µl buffer containing 5 pM recombinant TF (Dade Behring, Marburg, Germany), PV at 4 µM equivalent PS, 5 nM rabbit thrombomodulin (TM) (American Diagnostica, Greenwich, USA) and 4 µg/ml recombinant human tissue Plasminogen Activator (tPA) Actilyse® (Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany). Clot formation was initiated by addition of 10 µl of 100 mM CaCl<sub>2</sub>. To monitor clot lysis, absorbance was read kinetically at 405 nm using a microplate reader. To standardize the figure, for each sample basal OD after lysis was subtracted from each point of the curve. Half lysis time was defined as the time required to reach half-maximal variation in OD.

***Microscopy of fibrin fibers ultrastructure***

The thrombin generation assay was performed in order to generate fibrin for fixation using the same TF and PV concentrations as the CAT experiments. This was done using plasma on paper disks and a Rhodamine substrate was used (28). Immediately after thrombin generation was finished (50 min for each run), the mineral oil was removed from the well and a solution of glutaraldehyde (grade I) in phosphate buffered saline (PBS) (Sorensen's PBS, pH 7.2) was applied. This was put at room temperature for 1 h and then kept at 4°C overnight. The samples were then washed 5 times with PBS and a secondary fixation was performed in OsO<sub>4</sub> (1%) in sodium cacodylate (200 nM, pH 7.4) for 1h at RT. The samples were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol each during 3 min (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) and the last step (100%) was performed 3 times. Further dehydration was accomplished by a hexamethyldisilazane (HMDS)/ethanol solution (1:1) for 3 min and HMDS for 10 min. The samples were removed from the wells and left to dry. In order to visualize the samples with a Phenom G2Pro scanning electron microscopy (SEM) (Phenom-World, Eindhoven, the Netherlands), they were put on stubs using carbon tabs and coated with gold.

For each sample, 3 to 5 pictures were analysed. Fiber thickness was measured using ImageJ software (version 1.48v). For each picture 100 measurements were performed. The density of the fibers was calculated from the pictures by counting the number of fibers that crossed a line of 26.8 µm.

### ***Rat cytokine antibody array***

The Rat Cytokine Array Panel A (Cat # ARY008) from R&D system (Minneapolis, MN) was used to probe cytokines in PFP from MSZR and LZR by following the procedures recommended by the manufacturer. Bound antibodies were detected by chemiluminescence using the Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA).

### ***Cells culture***

The descending thoracic aorta was excised from rats after isoflurane anaesthesia (4.5% in 1.5 L/min dioxygen) and exsanguination. VSMCs were isolated as previously described (29). VSMCs were grown in DMEM/F12 supplemented with 10% foetal bovine serum (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% horse serum. For thrombin generation assays, VSMCs at passages 3-5 were seeded (7500 cells/well) in 96-well tissue culture flat-bottom plates (MICROTEST™96), grown to subconfluence and washed with HBS before use.

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

The chromogenic assay measuring the phospholipid-related procoagulant activity (PPA) in VSMCs was performed as described previously for plasma (30, 31). VSMCs cultured in 96 well plates were washed and 50 µl of 50 mM Tris, 175 mM NaCl, pH 7.9 (TBS) containing 2 g/l bovine serum albumin (BSA) were added as well as 50 µl of activated factor X (1.2 nM), activated factor V (2.4 nM), CaCl<sub>2</sub> (15 mM) and 50 µl of bovine prothrombin (6 µM) plus ZGly-Gly-Arg-AMC substrate (1.25 mM) in 20 mM HEPES pH 7.5 containing 60 g/l BSA. The plate was placed in the Fluoroskan Ascent fluorometer and allowed to warm up to 37°C for 5 minutes

before kinetic readings were taken over 10 minutes. Phospholipid concentration was estimated from the initial rate of thrombin formation by reference to a standard curve constructed with a mixture of phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine (20:20:60 mole %), and expressed as phosphatidylserine equivalents.

### ***Western blot***

Cell extracts were obtained by lysing VSMCs in complete Lysis-M buffer (Roche Diagnostics Corporation, Basel, Switzerland). Detergent-soluble fractions were retained, and protein concentrations in samples were determined using a Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, USA). Lysates containing 30 µg of protein were electrophoresed on polyacrylamide gels (gel 8%), transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (transblot turbo, Bio-Rad, Hercules, USA) and blotted with the following antibodies:  $\alpha$ -smooth muscle actin (Asma), 4/1000 (Sigma, St Louis, USA), smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC), 1/1000 (Abcam; Cambridge, UK); smoothelin, 1/500 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas Texas); integrin  $\alpha_v$ , 1/1000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas Texas); integrin  $\beta_3$  1/500 (Merck Millipore, Billerica, USA) and tubulin, 2/1000 (Sigma, St Louis, USA). After rinsing, incubation with secondary antibody rabbit 1/1000 ( $\alpha_v$ ,  $\beta_3$ , smoothelin, SM-MHC, Sigma St Louis, USA) and mouse 1/1000 (aSMA, tubulin, Sigma, St Louis, USA). Reactions were visualised by the ECL Western Blot Detection Kit (Bio-Rad, Hercules, USA) after incubation with peroxidase conjugates 1/2000 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

### ***In situ gelatin zymography***

*In situ* gelatin zymography was performed to determine the gelatinase activity across the aortic wall using DQ-gelatin (Life Technologies, Paisley, UK) as previously described (32). Fluorescein isothiocyanate (FITC, 1/110), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1/150) filters were used to visualise the degree of gelatinase activity and the localisation of nuclear tissue by fluorescence microscopy using a x 20 optical objective (Keyence, Osaka, Japan). Analysis of average fluorescence was performed for 3, 20 µm thick profile lines across 3 arterial wall regions for each sample.

### ***Zymography analysis***

VSMCs from LZR or MSZR (passage 4-6) were seeded (50 000 cells/well) in 6-well culture plates in 10% serum-containing medium (DMEM/F-12), supplemented with 10% foetal bovine serum (life technology Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Cells were grown to subconfluence and after 16 h in serum-free medium, cells were washed with PBS (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), medium was changed and cells were incubated for 4 h-8 h or 20 h at 37°C. Conditioned media were removed at 4 h-8 h and 16 h and centrifuged at 500 g for 10 min at room temperature and used for the determination of MMP-2 secretion.

Conditioned media were analyzed for gelatin degradation by electrophoresis under non-reducing conditions on a 10 % polyacrylamide-SDS gel containing 0.1% gelatin. Gels were washed for 1 h at room temperature in a 2% triton X-100 solution and incubated overnight at 37°C in 50 mM Tris-HCl/10 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.6) buffer.

Gels were stained in a 0.1% coomassie Blue (G250)/45% methanol/10% acetic acid solution and de-stained in a 10% acetic acid/20% methanol solution. White lysis strips, indicative of gelatinolytic activity, were revealed and scanned (Fujifilm LAS 4000, Life sciences, Branford, USA). Densitometric analysis was made using MultiGauge software (Fuji, Tokyo, Japan). 1% SVF diluted in serum free medium was used as a positive control.

### ***Statistical analysis***

Results are presented as mean  $\pm$  standard error to the mean. Data were analyzed by a two-way ANOVA, followed by a Fisher's test for multiple comparisons to evaluate the influence of age and strain and their interaction on the different variables. In the case of SEM measurements, the differences in fiber thickness were analyzed using the Mann Whitney U test.

## Results

*Platelet aggregation, thrombin generation and fibrinolysis were all impaired with the metabolic syndrome and/or aging.*

Platelet count of the LZR and MSZR was made in total blood. Platelet count was increased in MSZR at both ages compared to the same aged LZR (Table 1). Platelet aggregation using washed platelets and collagen as a strong agonist was not significantly modified as shown by the mean maximum aggregation (Figure 1A). Regarding platelet aggregation in PRP using ADP, mean maximum aggregation was increased in 80 week-old MSZR and LZR compared to 25 week-old controls (Figure 1B). The F1+2 fragment was analysed to evaluate the *in vivo* reactivity of the coagulation system. The amount of F1+2 fragment was increased in 25 week-old MSZR compared to the same aged LZR (Table 1). Thrombin generation measurement was performed as an integrative *in vitro* phenotype of coagulation. Adult and very old MSZR had a significantly increased endogenous thrombin potential (ETP) compared to same aged LZR. The other thrombin generation parameters (lag time, peak, and velocity) were not significantly changed except for the time to peak which was increased in obese at both ages (Table 1; Figure. 1C). The ratio of thrombin generation in PFP and PRP compared to 25 week-old LZR was made to evaluate platelet reactivity impact on thrombin generation. Interestingly, thrombin generation was more increased in PRP from MSZR at 25 week of age compared to 80 week-old rats (Figure. 1D). Concerning the coagulation parameters, TF, TFPI, prothrombin and fibrinogen, they were all increased in MSZR compared to LZR at both ages. TFPI was also decreased and fibrinogen was increased with age in MSZR while prothrombin was decreased with age in LZR.



TAT measurement showed no modification in MSZR and LZR rats (Table 1). Fibrinogen levels in plasma were increased in MSZR compared to LZR in 25 and 80 week-old rats and aging increased only fibrinogen levels in 80 week-old MSZR (Table 1). Fibrin clots were characterised by SEM. Computerised analysis of the SEM images showed a decrease of fibrin fiber thickness in MSZR compared to LZR at both ages while fiber density was only increased in 80 week-old LZR (Figure. 1E-G). The fibrinolytic process was investigated with a fibrinolysis test (Figure. 1H). Half-time lysis was decreased in MSZR compared to LZR at both ages and aging significantly increased half-time lysis in both groups (Figure. 1I). Maximal lysis speed was not modified (Figure. 1J).

***Inflammation, metabolic factors and free fatty acids modify thrombin generation.***

Supplementation of plasma with adiponectin, leptin, fibrinogen, linoleic acid or palmitic acid modified thrombin generation in 25 week-old LZR. Fibrinogen concentration was highly correlated to ETP and supplementing plasma with fibrinogen gradually increased ETP (Figure. 2A-B). Adiponectin decreased ETP and leptin increased it (Figure. 2C-D). Linoleic acid supplementation did not significantly increase ETP while palmitic acid significantly increased ETP in 25 week-old LZR PFP (Figure. 2E-F).

***Plasma cytokines were increased both with MetS and aging.***

To explore inflammation in our model we performed a plasma cytokine array of 27 cytokines (Figure. 3). Panel A presents pictures of the cytokine array membranes. We identified four patterns of cytokines. The first group of 5 cytokines showed no modification (TIMP-

1, metallopeptidase inhibitor 1; RANTES, Chemokine (C-C motif) ligand 5; LIX, C-X-C motif chemokine 5; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule 1 and L-selectine), a second group of 8 cytokines were increased with MetS (Figure. 3B), a third group of 3 cytokines were increased with aging (Figure. 3C) and a last group of 11 cytokines were increased with both MetS and aging (Figure. 3D).

***MetS and aging related inflammation and haemostasis impairment were related to alteration of VSMCs.***

To explore the contribution of SMCs, thrombin generation was measured at the surface of cultured VSMCs isolated from LZR and MSZR. Thrombin generation with PFP from LZR and MSZR was always increased at the surface of MSZR VSMCs compared to LZR VSMCs. Remarkably, addition of palmitic acid in LZR VSMCs increased thrombin generation to the level of MSZR independently of the PFP used (Figure 4A). MSZR VSMCs displayed increased procoagulant phospholipids at their surface compared to LZR VSMs (Figure 4B). Integrin subunit  $\alpha_v$  was increased in MSZR compared to LSZ VSMs while  $\beta_3$  was not modified. VSMCs differentiation markers  $\alpha$ -SMA, SM-MHC and smoothelin, interestingly, were all decreased in MSRZ VSMCs compared to LZR VSMCs (Figure 4C-D). Thus, *in situ* gelatin zymography was performed to explore MMP activity through gelatinase activity (Figure 4E). Figure 4E shows representative photographs of *in situ* gelatin zymography in aorta, gelatinase activity is in green. Mean gelatinase activity in the aortic wall was increased in 25 and 80 week-old MSZR compared to age matched LZR (Figure 4F). However, age did not modulate gelatinase activity.

At the cellular level MSZR display increased MMP2 secretion compared to LZR VSMCs (Figure 4G-H).

## **Discussion**

The aim of the present study was to determine concomitant changes in the haemostasis system and VSMC phenotype and their interplay with free fatty acids and MMPs during aging in obese rats compared to lean rats of the same age. The main new findings reported here are as follows: (1) thrombin generation, platelet count and fibrin fiber formation speed were increased and fibrinolysis was decreased in obese rats while ADP platelet aggregation and fibrinolysis were increase with age in both strains. (2) Obesity related adipokines (leptin, adiponectin) and free fatty acids (palmitic acid) changed directly thrombin generation. (3) Increased plasmatic proinflammatory cytokines led to an altering of the VSMCs phenotype and vascular remodeling through increased gelatinase activity.

The increased thrombotic risk can be attributed to three factors: abnormalities in the vessel wall, in blood flow, and in haemostasis including coagulation and fibrinolysis. We found previously that MSZR presented endothelial dysfunction as shown by increased circulating von Willebrand Factor (vWF). This endothelial dysfunction was exacerbated during aging as shown by increases in both vWF and soluble CD146 (23).

Few studies have used the Zucker rat to look at haemostasis and to our knowledge none have been performed in very old Zucker rats. Paul *et al* found that 12 week-old diabetic Zucker rats presented unmodified *in vitro* platelet reactivity (33). Recently Shang *et al* have shown an

increased thrombosis, increased thrombin generation and decreased fibrinolysis in 7 to 10 week-old diabetic Zucker rats (34). They found also a decreased platelet reactivity to collagen and ADP in obese rats in PRP. We found, in PRP, an increased platelet aggregation using ADP in 80 week-old MSZR and LZR rats compared to 25 week-old controls, but not between same aged rats and were not able to aggregate platelets using collagen. Washed platelets were able to aggregate when triggered with collagen but we did not find any significant changes in obese rats or with age. These changes might be related to the metabolic differences existing between rats since they used diabetic Zucker rats while we used obese Zucker rats that only develop diabetes very late with age. Moreover, platelet count was not modified in Shang *et al* Zucker rats while we found a 25% increased count in MSZR compared to LZR at both ages. Interestingly, platelet-related thrombin generation showed a very important increase in 25 week-old MSZR compared to thrombin generation made with PFP. Altogether, increased platelet aggregation to ADP with age concomitant to increased platelet count in obese Zucker rats is in favor of a prothrombotic state.

To better assess the prothrombotic state in obese and aged rats we investigated *in vivo* thrombin generation by measuring F1+2 fragment, which was increased in MSZR indicating increased *in vivo* formation of thrombin with MetS. As expected, MetS also increased the *in vitro* thrombin generation capacity of plasma, but this ability was not modified with age. This change in the *in vitro* reactivity of the coagulation system points out the role of several components including metabolic factors and the vascular wall. Regarding individual clotting factors it appears that TF factor increased in MSZR as well as its inhibitor (TFPI). The prothrombin increase partially explains the increased ETP. Other procoagulant factors such as FVII, FVIII

and vWF are known to be increased with MetS and aging (9,35). Metabolic factors such as leptin and adiponectin can participate to hemostasis. It has been previously reported that leptin enhanced platelet aggregation while adiponectin reduced it (20,22). Adiponectin has also been involved in the endothelium anticoagulation function since it increased endothelial TFPI synthesis (21). We found in all Zucker rats a strong correlation between plasma TPF1 and adiponectin concentrations previously dosed (data not shown) (23). Moreover, in our study, we found for the first time that leptin increases ETP and that adiponectin decreased it. Despite it being a modest effect, it argues for a major involvement of adipokines in the regulation of thrombin generation.

Fibrinogen concentration was also correlated to ETP and we confirmed that increased plasma fibrinogen increases ETP. Thrombin linked to fibrin can possibly be protected from inhibition by antithrombin, in the same way as it is protected from inhibition when fixed to TM (36). This may participate in explaining the increased time to peak observed in MSZR and increased ETP with no significantly increased peak.

We found that fibrinogen concentration was increased in MSZR and during aging. In favor of the relevance of this result it has been shown that synthesis of fibrinogen is upregulated by inflammatory cytokines such as IL-6 (37). The consequence of an increased thrombin generation was an increased fibrin network formation in MSZR as shown by thinner fibrin fibers. It is known that fibrinolysis is impaired in the MetS with a decrease in clot lysis ability linked to increased PAI-1 (38). During aging PAI-1 is associated with an increased thrombotic risk and the fibrinogen concentration is known to be increased during aging but the mechanisms underlying this association with thrombotic risk are unclear (39). Organization of the fibrin

network is likely due to the increased thrombin generation found in MSZR (40,41). Moreover, clots with thinner fibrin fibers are more resistant to fibrinolysis than clots with thick fibers (42). This is supported by the increased half-time lysis found in MSZR and very old Zucker rats. Other factors must be implicated during aging since fiber thickness was increased in both groups but fibrinolysis time increased only during aging indicating the formation of a denser clot. In this line adiponectin may act as an anticoagulant molecule. Indeed, full length adiponectin reduces platelet aggregation, inhibits TF and enhances TFPI expression at the surface of endothelial cells (20,21). Both adiponectin and IL-13 increase the expression of metalloproteinases which can degrade fibrinogen (43–45). Whether adiponectin directly interplays with fibrinogen remains an open question.

Inflammation during aging and in the MetS triggers vascular remodelling (46). Fibrinogen (47) as well as fibrin and fibrin degradation products have proinflammatory functions that can modify the vascular smooth muscle cell (SMCs) phenotype (48). Cytokines in the plasma, as shown in the array presented here, are increased by the MetS, aging, or both. Our data indicated that the more relevant proinflammatory cytokines such as IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, and IL-6 were increased early with the MetS while few anti-inflammatory cytokines were increased with MetS and aging (IL-10, IL-1ra, IL-17).

Other factors related to MetS that can potentiate the modifications we observed in MSZR haemostasis are free fatty acids. Saturated free fatty acids such as palmitic acid are known to be associated with ischemic heart disease and increase postprandial concentrations of fibrinogen (49,50). One other mechanism recently proposed to explain the thrombogenic effect of palmitic acid was its ability to induce extracellular release of histones (51). Histones are

known to promote thrombin generation through platelet activation (52). Additionally, palmitic acid was recently measured in diabetic Zucker rats pointing out a 2,75 times increased concentration in obese rats (0,68 g/l in LZR vs 1,87 g/l) (53). A similar increase was observed for a polyunsaturated free fatty acid, linoleic acid. We supplemented 25 week-old LZR PFP with linoleic or palmitic acid to reach MSZR plasma concentrations. While plasma addition of linoleic acid showed a tendency of increase but did not reach significance, we showed for the first time a direct effect of palmitic acid on thrombin generation confirming its prothrombotic effect.

All these free fatty acids, pro-inflammatory cytokines and coagulation factors can have a deleterious effect on the vascular wall. We have shown previously the presence of endothelial dysfunction in MSZR (23). In the present study we studied more in detail VSMCs. Interestingly, thrombin generation measured at the surface of VSMCs from MSZR was increased compared to LZR SMCs. This increase can be related to the increased procoagulant phospholipid at the surface of MSZR VSMCs. We showed recently that thrombin generation at the surface of VSMC from spontaneously hypertensive rats (SHR) leads to increased ETP and VSMCs were responsible for a prothrombotic phenotype in SHR rats. In the same way as for SHR rats, increased procoagulability of VSMCs can be a mechanism implicated in the prothrombotic phenotype we have observed in Zucker rats. In these cellular experiment addition of palmitic acid also exacerbated thrombin generation over MSZR VSMCs.

MMPs are related to free fatty acids, obesity-related diseases such as type 2 diabetes and overall, inflammation. In our model, mean gelatinase activity, focusing on MMP-2 and -9 activities, was increased in MSZR. These molecules are responsible for the degradation of type

IV collagen, elastin, fibronectin and laminin, among other proteins. It is known that free fatty acids and insulin lead to hyperactivity of MMP-2 and -9 (54). The close relation between MMPs and insulin was also demonstrated in Zucker rats (55) IL-13 was increased in old rats and is known to be an activator of MMPs (43). This increase in aortic MMP activity in the intima with aging has been described in rats and was twofold higher in old versus young nonhuman primates (46,56). In addition, MMP activity may also participate in age-related vascular remodeling in the aortic media since MMPs accumulate around elastic fibers in the aortic media (56), which become fragmented with age-associated increases in arterial stiffness and this thus increases cardiovascular risk (57). Interestingly, MMPs production can be stimulated through integrin  $\alpha$   $\beta$ 3 (58). Concerning this pathway, we found an increase of the  $\alpha$ v subunit in MSZR VSMCs and MMP2 secretion was increased in MSZR compared to LZR. Moreover, one of our previous works has shown that this integrin is responsible for thrombin generation supported by VSMC and supports its role in vascular remodeling (59). Very interestingly all VSMC differentiation markers we tested were downregulated in MSZR and even absent concerning SM-MHC. This illustrates a phenotype switch from contractile to secreting VSMC occurring in vascular diseases such as atherosclerosis (60).

In conclusion, the present study demonstrates a coupling between plasma inflammation and metabolic factors, leading to enhanced hemostasis and vascular MMP activity, resulting in VSMCs phenotype alterations worsening the vascular condition. Elevated plasma levels of fibrinogen, leptin and saturated free fatty acids as well as increased platelet counts and reactivity, and reduction of fibrinolysis in obese rats may represent relevant mechanisms for



these connections. Increased thrombin generation in plasma may have also deleterious cellular effects within the vessel wall, in particular mitogenic effects and migration of VSMCs and endothelial cells through MMPs over activation. The potential benefit of direct thrombin inhibitors should be investigated both on haemostatic balance in blood compartments and on the cellular phenotypic modulation within the vessel wall and MMP production in MetS and its complications with aging.

## References

1. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*. 2005 Mar 22;111(11):1448–54.
2. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Jan 30;49(4):403–14.
3. Weiss TW, Arnesen H, Seljeflot I. Components of the interleukin-6 transsignalling system are associated with the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and arterial stiffness. *Metabolism*. 2013 Jul;62(7):1008–13.
4. Halcox JPJ, Donald AE, Ellins E, Witte DR, Shipley MJ, Brunner EJ, et al. Endothelial function predicts progression of carotid intima-media thickness. *Circulation*. 2009 Feb 24;119(7):1005–12.
5. Wang M, Takagi G, Asai K, Resuello RG, Natividad FF, Vatner DE, et al. Aging increases aortic MMP-2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. *Hypertension*. 2003 Jun;41(6):1308–16.
6. Cicero AFG, Derosa G, Manca M, Bove M, Borghi C, Gaddi AV. Vascular remodeling and prothrombotic markers in subjects affected by familial combined hyperlipidemia and/or metabolic syndrome in primary prevention for cardiovascular disease. *Endothel J Endothel Cell Res*. 2007 Oct;14(4-5):193–8.
7. Samad F, Pandey M, Loskutoff DJ. Regulation of tissue factor gene expression in obesity. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3353–8.
8. Sonnenberg GE, Krakower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obes Res*. 2004 Feb;12(2):180–6.

## Chapitre 1 : Implication des CMLVs dans la génération de thrombine et la thrombose artérielle dans l'hypertension artérielle et le syndrome métabolique.

### Article 2, résultats principaux et résultats complémentaires

---

9. Lim HS, Lip GYH, Blann AD. Plasma von Willebrand factor and the development of the metabolic syndrome in patients with hypertension. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Nov;89(11):5377–81.
10. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, et al. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet Lond Engl.* 1986 Sep 6;2(8506):533–7.
11. MacCallum PK, Brennan PJ, Meade TW. Minimum effective intensity of oral anticoagulant therapy in primary prevention of coronary heart disease. *Arch Intern Med.* 2000 Sep 11;160(16):2462–8.
12. Beijers HJBH, Ferreira I, Spronk HMH, Bravenboer B, Dekker JM, Nijpels G, et al. Body composition as determinant of thrombin generation in plasma: the Hoorn study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Dec;30(12):2639–47.
13. Beijers HJBH, Ferreira I, Spronk HMH, Bravenboer B, Dekker JM, Nijpels G, et al. Impaired glucose metabolism and type 2 diabetes are associated with hypercoagulability: potential role of central adiposity and low-grade inflammation--the Hoorn Study. *Thromb Res.* 2012 May;129(5):557–62.
14. Alessi M-C, Juhan-Vague I. PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Oct;26(10):2200–7.
15. Suehiro A, Wakabayashi I, Uchida K, Yamashita T, Yamamoto J. Impaired spontaneous thrombolytic activity measured by global thrombosis test in males with metabolic syndrome. *Thromb Res.* 2012 Apr;129(4):499–501.
16. Corgosinho FC, de Piano A, Sanches PL, Campos RM, Silva PL, Carnier J, et al. The role of PAI-1 and adiponectin on the inflammatory state and energy balance in obese adolescents with metabolic syndrome. *Inflammation.* 2012 Jun;35(3):944–51.
17. Poli KA, Tofler GH, Larson MG, Evans JC, Sutherland PA, Lipinska I, et al. Association of blood pressure with fibrinolytic potential in the Framingham offspring population. *Circulation.* 2000 Jan 25;101(3):264–9.
18. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jan;24(1):29–33.
19. Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50(Suppl):S138–43.
20. Restituto P, Colina I, Varo JJ, Varo N. Adiponectin diminishes platelet aggregation and sCD40L release. Potential role in the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 May;298(5):E1072–7.

## Chapitre 1 : Implication des CMLVs dans la génération de thrombine et la thrombose artérielle dans l'hypertension artérielle et le syndrome métabolique.

### Article 2, résultats principaux et résultats complémentaires

---

21. Chen Y-J, Zhang L-Q, Wang G-P, Zeng H, Lü B, Shen X-L, et al. Adiponectin inhibits tissue factor expression and enhances tissue factor pathway inhibitor expression in human endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2008 Aug;100(2):291–300.
22. Konstantinides S, Schäfer K, Koschnick S, Loskutoff DJ. Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest.* 2001 Nov;108(10):1533–40.
23. Sloboda N, Fève B, Thornton SN, Nzietchueng R, Regnault V, Simon G, et al. Fatty acids impair endothelium-dependent vasorelaxation: a link between obesity and arterial stiffness in very old Zucker rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2012 Sep;67(9):927–38.
24. Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet.* 1996 May;13(1):18–9.
25. Van Zwieten PA, Kam KL, Pijl AJ, Hendriks MG, Beenen OH, Pfaffendorf M. Hypertensive diabetic rats in pharmacological studies. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc.* 1996 Feb;33(2):95–105.
26. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(1):4–15.
27. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res.* 2004;114(5-6):539–45.
28. Ninivaggi M, Apitz-Castro R, Dargaud Y, de Laat B, Hemker HC, Lindhout T. Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. *Clin Chem.* 2012 Aug;58(8):1252–9.
29. Ait Aissa K, Lagrange J, Mohamadi A, Louis H, Houppert B, Challande P, et al. Vascular smooth muscle cells are responsible for a prothrombotic phenotype of spontaneously hypertensive rat arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Apr;35(4):930–7.
30. Membre A, Wahl D, Latger-Cannard V, Max J-P, Lacolley P, Lecompte T, et al. The effect of platelet activation on the hypercoagulability induced by murine monoclonal antiphospholipid antibodies. *Haematologica.* 2008 Apr;93(4):566–73.
31. Wagenvoord RJ, Hendrix HH, Kai H, Hemker HC. A chromogenic test to determine the procoagulant phospholipids in platelet-rich plasma and whole blood. *Thromb Haemost.* 1994 Oct;72(4):582–7.
32. Mook ORF, Van Overbeek C, Ackema EG, Van Maldegem F, Frederiks WM. In situ localization of gelatinolytic activity in the extracellular matrix of metastases of colon cancer in rat liver using quenched fluorogenic DQ-gelatin. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 2003 Jun;51(6):821–9.

## Chapitre 1 : Implication des CMLVs dans la génération de thrombine et la thrombose artérielle dans l'hypertension artérielle et le syndrome métabolique.

### Article 2, résultats principaux et résultats complémentaires

---

33. Paul W, Queen LR, Page CP, Ferro A. Increased platelet aggregation in vivo in the Zucker Diabetic Fatty rat: differences from the streptozotocin diabetic rat. *Br J Pharmacol*. 2007 Jan;150(1):105–11.
34. Shang J, Chen Z, Wang M, Li Q, Feng W, Wu Y, et al. Zucker Diabetic Fatty rats exhibit hypercoagulability and accelerated thrombus formation in the Arterio-Venous shunt model of thrombosis. *Thromb Res*. 2014 Aug;134(2):433–9.
35. Kotronen A, Joutsu-Korhonen L, Sevastianova K, Bergholm R, Hakkarainen A, Pietiläinen KH, et al. Increased coagulation factor VIII, IX, XI and XII activities in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2011 Feb;31(2):176–83.
36. Bourin MC. [Effect of rabbit thrombomodulin on the inhibition of thrombin by the antithrombin-heparin complex: role of the acid domain of thrombomodulin]. *Comptes Rendus Académie Sci Sér III Sci Vie*. 1987;304(8):173–6.
37. Morozumi T, Sharma A, De Nardin E. The functional effects of the -455G/A polymorphism on the IL-6-induced expression of the beta-fibrinogen gene may be due to linkage disequilibrium with other functional polymorphisms. *Immunol Invest*. 2009;38(3-4):311–23.
38. Pandolfi A, Cetrullo D, Polishuck R, Alberta MM, Calafiore A, Pellegrini G, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Aug;21(8):1378–82.
39. Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther*. 2010 Oct;28(5):e72–91.
40. Ryan EA, Mockros LF, Weisel JW, Lorand L. Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys J*. 1999 Nov;77(5):2813–26.
41. Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev*. 2007 May;21(3):131–42.
42. Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM. The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *J Biol Chem*. 1992 Dec 5;267(34):24259–63.
43. Firszt R, Francisco D, Church TD, Thomas JM, Ingram JL, Kraft M. Interleukin-13 induces collagen type-1 expression through matrix metalloproteinase-2 and transforming growth factor- $\beta$ 1 in airway fibroblasts in asthma. *Eur Respir J*. 2014 Feb;43(2):464–73.
44. Wanninger J, Walter R, Bauer S, Eisinger K, Schäffler A, Dorn C, et al. MMP-9 activity is increased by adiponectin in primary human hepatocytes but even negatively correlates with serum adiponectin in a rodent model of non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Mol Pathol*. 2011 Oct;91(2):603–7.

## Chapitre 1 : Implication des CMLVs dans la génération de thrombine et la thrombose artérielle dans l'hypertension artérielle et le syndrome métabolique.

### Article 2, résultats principaux et résultats complémentaires

---

45. Hotary KB, Yana I, Sabeh F, Li X-Y, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, et al. Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP-dependent and -independent processes. *J Exp Med*. 2002 Feb 4;195(3):295–308.
46. Wang M, Zhang J, Jiang L-Q, Spinetti G, Pintus G, Monticone R, et al. Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2007 Jul;50(1):219–27.
47. Lominadze D, Dean WL, Tyagi SC, Roberts AM. Mechanisms of fibrinogen-induced microvascular dysfunction during cardiovascular disease. *Acta Physiol Oxf Engl*. 2010 Jan;198(1):1–13.
48. Lu P, Liu J, Liu N, Guo F, Ji Y, Pang X. Pro-inflammatory effect of fibrinogen and FDP on vascular smooth muscle cells by IL-6, TNF- $\alpha$  and iNOS. *Life Sci*. 2011 May 9;88(19-20):839–45.
49. Simon JA, Hodgkins ML, Browner WS, Neuhaus JM, Bernert JT, Hulley SB. Serum fatty acids and the risk of coronary heart disease. *Am J Epidemiol*. 1995 Sep 1;142(5):469–76.
50. Pacheco YM, Bermúdez B, López S, Abia R, Villar J, Muriana FJG. Ratio of oleic to palmitic acid is a dietary determinant of thrombogenic and fibrinolytic factors during the postprandial state in men. *Am J Clin Nutr*. 2006 Aug;84(2):342–9.
51. Shrestha C, Ito T, Kawahara K, Shrestha B, Yamakuchi M, Hashiguchi T, et al. Saturated fatty acid palmitate induces extracellular release of histone H3: a possible mechanistic basis for high-fat diet-induced inflammation and thrombosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Aug 9;437(4):573–8.
52. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, Dale GL, Friese P, Esmon NL, et al. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*. 2011 Aug 18;118(7):1952–61.
53. Godin J-P, Ross AB, Cléroux M, Pouteau E, Montoliu I, Moser M, et al. Natural carbon isotope abundance of plasma metabolites and liver tissue differs between diabetic and non-diabetic Zucker diabetic fatty rats. *PloS One*. 2013;8(9):e74866.
54. Boden G, Song W, Pashko L, Kresge K. In vivo effects of insulin and free fatty acids on matrix metalloproteinases in rat aorta. *Diabetes*. 2008 Feb;57(2):476–83.
55. Zhou Y-P, Madjidi A, Wilson ME, Nothhelfer DA, Johnson JH, Palma JF, et al. Matrix metalloproteinases contribute to insulin insufficiency in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes*. 2005 Sep;54(9):2612–9.
56. Li Z, Froehlich J, Galis ZS, Lakatta EG. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1999 Jan;33(1):116–23.
57. Wagenseil JE, Mecham RP. Elastin in large artery stiffness and hypertension. *J Cardiovasc Transl Res*. 2012 Jun;5(3):264–73.

## Chapitre 1 : Implication des CMLVs dans la génération de thrombine et la thrombose artérielle dans l'hypertension artérielle et le syndrome métabolique.

### Article 2, résultats principaux et résultats complémentaires

---

58. Bendeck MP, Irvin C, Reidy M, Smith L, Mulholland D, Horton M, et al. Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via  $\alpha(v)\beta(3)$  integrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jun;20(6):1467–72.
59. Mao X, Said R, Louis H, Max J-P, Bourhim M, Challande P, et al. Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin  $\alpha v \beta 3$  pathway. *Cardiovasc Res.* 2012 Dec 1;96(3):513–23.
60. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel J-B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res.* 2012 Jul 15;95(2):194–204.

### **Figure legends**

**Figure 1: Platelet aggregation in LZR and MSZR rats.** Mean maximum platelet aggregation in washed platelets in response to collagen (5  $\mu\text{g/ml}$ ) (A) and in PRP ADP (5  $\mu\text{M}$ ) (B) using PRP adjusted at  $200 \times 10^9$  platelets/l. Calibrated automated thrombography (CAT) in rat plasma. Mean thrombin generation curves in platelet free plasma triggered by 5 pM TF in LZR and MSZR at 25 and 80 weeks old (C). Ratio to 25 week-old LZR of ETP of thrombin generation in PFP and PRP in 25 and 80 week-old LZR and MSZR (D). Ultrastructure of fibrin fibers was visualized by scanning electron microscopy. Pictures were made at 10.000 x magnification (E). Fiber thickness and fiber density of fibrin clot in LZR and MSZR (F, G). Representative curves of fibrinolytic tests in platelet free plasma in LZR and MSZR (H). Half-time lysis and maximal lysis speed of fibrinolytic tests in LZR and fa/fa (I, J). Results are mean  $\pm$  standard error to the mean ( $n = 7-11$ ). \*  $p < 0.05$ , MSZR vs LZR at the same age; †  $p < 0.05$ , 80 vs 25 week-old in the same strain.

### **Figure 2: Effect of Fibrinogen, adipokines and free fatty acids on thrombin generation.**

Correlation between ETP and plasma fibrinogen concentration of 25 and 80 week-old LZR and MSZR, ( $R = 0.069$ ,  $p = 0.01$ ) (A). ETP of thrombin generation in 25 week-old LZR platelet free plasma supplemented with 0.5 1.0 or 2.0 and 2.5 g/l fibrinogen (B). ETP of thrombin generation in 25 week-old LZR platelet free plasma supplemented with 0.05 0.10 or 1.00 ng/ml leptin (C). ETP of thrombin generation in 25 week-old LZR platelet free plasma supplemented with 2, 4, or 8  $\mu\text{g/ml}$  adiponectin (D). ETP of thrombin generation in 25 week-old LZR platelet free plasma supplemented with 0.75 1.5 or 3 mg/ml of linoleic acid (E). ETP of thrombin

generation in 25 week-old LZR platelet free plasma supplemented with 0.75 1.5 or 3 mg/ml of palmitic acid (F). Results are mean  $\pm$  standard error to the mean ( $n = 7-11$ ). \*  $p < 0.05$  compared to 0.

**Figure 3: Plasma cytokine array in Zucker rat.** Cytokine arrays of platelet free plasma from 25 and 80 week-old MSZR and LZR (A). Relative chemoluminescence compared to 25 week-old LZR was measured. Cytokines modified with MetS (B), with age (C), or both with MetS and age (D). VEGF, vascular endothelial growth factor; CINC-1, cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1; CINC-3, cytokine-induced neutrophil chemoattractant 3; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; MIP, macrophage inflammatory protein; MIG, C-X-C motif ligand 9; IP-10, interferon gamma-induced protein 10; CNTF, ciliary neurotrophic factor;  $INF\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; IL, interleukin. Pooled plasma from 5 to 6 rats in each group was used.

**Figure 4: Role of smooth muscle cells in thrombin generation.** ETP of thrombin generation measured at the surface of VSMCs from LZR and MSZR with LZR or MSZR PFP and with or without 1.5 g/l palmitic acid (A). Results are means  $\pm$  standard error to the mean,  $n = 3$  with 6 well per condition per experiment. \*  $p < 0.05$  vs LZR VSMC. VSMC associated procoagulant activity reported as phosphatidylserine equivalent in LRZ and MSZR (B) Results are mean  $\pm$  standard error to the mean ( $n=25$ ). \*  $p < 0.05$ , MSZR vs LZR. Typical Western blot (C) and quantification analysis (D) of VSMC differentiation markers ( $\alpha$ SMA, SM-MHC and smoothelin) and integrin subunits ( $\alpha v$  and  $\beta 3$ ) in cultured VSMC. Results are mean  $\pm$  standard



error of the mean (n=6). \*  $p < 0.05$ , MSZR vs LZR. Representative images of gelatinolytic metalloproteinase activity in the aorta was measured using *in situ* gelatin zymography for each group of Zucker rats (E). Fluorescence as marker for intra-plaque gelatinolytic activity was quantified. Nuclei were visualized by DAPI staining. Average wall fluorescence of the gelatinolytic metalloproteinase activity in the aorta (F). Representative images of zymography gel of LZR and MSZR VSCMCs supernatant at 4 h, 8 h and 20 h (G). Relative MMP2 expression in LZR and MSZR VSMCs supernatant at 4 h, 8 h and 20 h (H). Results are mean  $\pm$  standard error to the mean ( $n = 5$ ). \*  $p < 0.05$ , MSZR vs LZR at the same age; †  $p < 0.05$ , 80 vs 25 week-old in the same strain.

**Table 1: Blood coagulation parameters and thrombin generation parameters of LZR and MSZR at 25 and 80 week-old.**

	25 week-old		80 week-old		ANOVA		
	LZR	MSZR	LZR	MSZR	Strain	Age	Interaction
<i>n</i>	9	10	12	9			
<b>Platelets (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	574±37	789±34*	633±29	834±63*	≤ 0.0001	0.009	0.013
<b>F1+2 (pmol/l)</b>	4.1 ± 0.5	7.9 ± 1.0 *	5.8 ± 1.2	5.5 ± 0.9	0.009	0.7	0.05
<b>FT (pM)</b>	0.3 ± 0.1	12.2 ± 1.7 *	2.0 ± 0.4	9.9 ± 1.5 *	≤ 0.0001	0.8	0.09
<b>TFPI activity (U/ml)</b>	4.9 ± 0.2	11.2 ± 0.2	5.4 ± 0.2	9.9 ± 0.6	≤ 0.0001	0.3	0.01
<b>Prothrombin (%)</b>	94 ± 3	223 ± 19 *	155 ± 14 †	264 ± 16 *	≤ 0.0001	0.002	0.5
<b>AT (%)</b>	129 ± 2	125 ± 2	127 ± 1	123 ± 3	0.04	0.5	0.9
<b>Fibrinogen (g/l)</b>	2.8 ± 0.1	4.0 ± 0.2 *	3.1 ± 0.1	4.9 ± 0.2 * †	≤ 0.0001	0.0003	0.2
<i>n</i>	11	11	10	7			
<b>Lag time (min)</b>	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.09	0.4	0.6
<b>Peak (nM)</b>	99 ± 8	121 ± 9	102 ± 10	117 ± 15	0.07	0.98	0.7
<b>Time to peak (min)</b>	4.4 ± 0.1	5.2 ± 0.3 *	4.1 ± 0.1	5.3 ± 0.2 *	≤ 0.0001	0.6	0.3
<b>ETP (nM.min)</b>	395 ± 37	549 ± 52 *	362 ± 34	553 ± 76 *	0.001	0.8	0.8
<b>velocity (nM/min)</b>	35 ± 3	37 ± 4	40 ± 4	31 ± 4	0.6	0.98	0.2

Figure

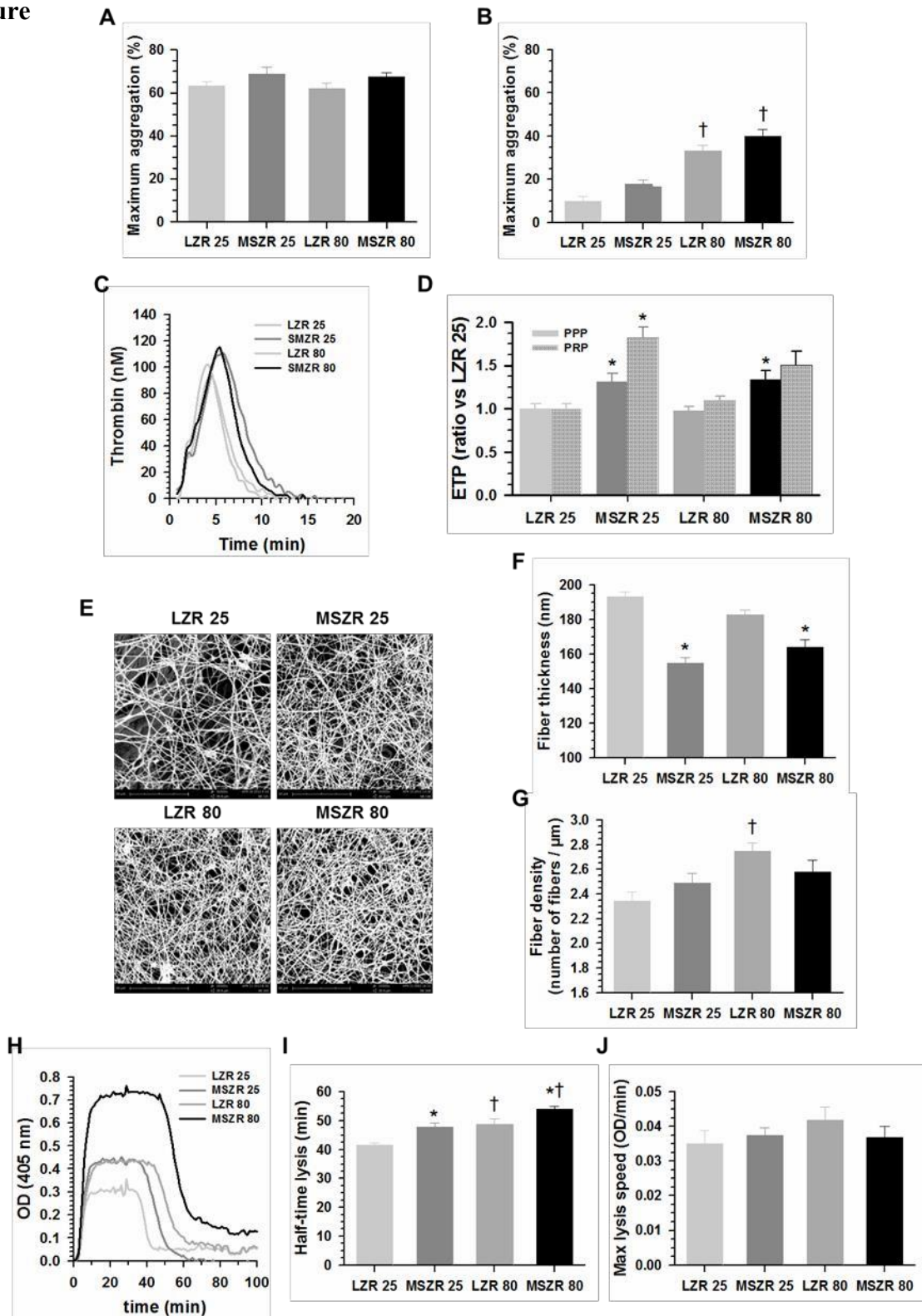


Figure 2

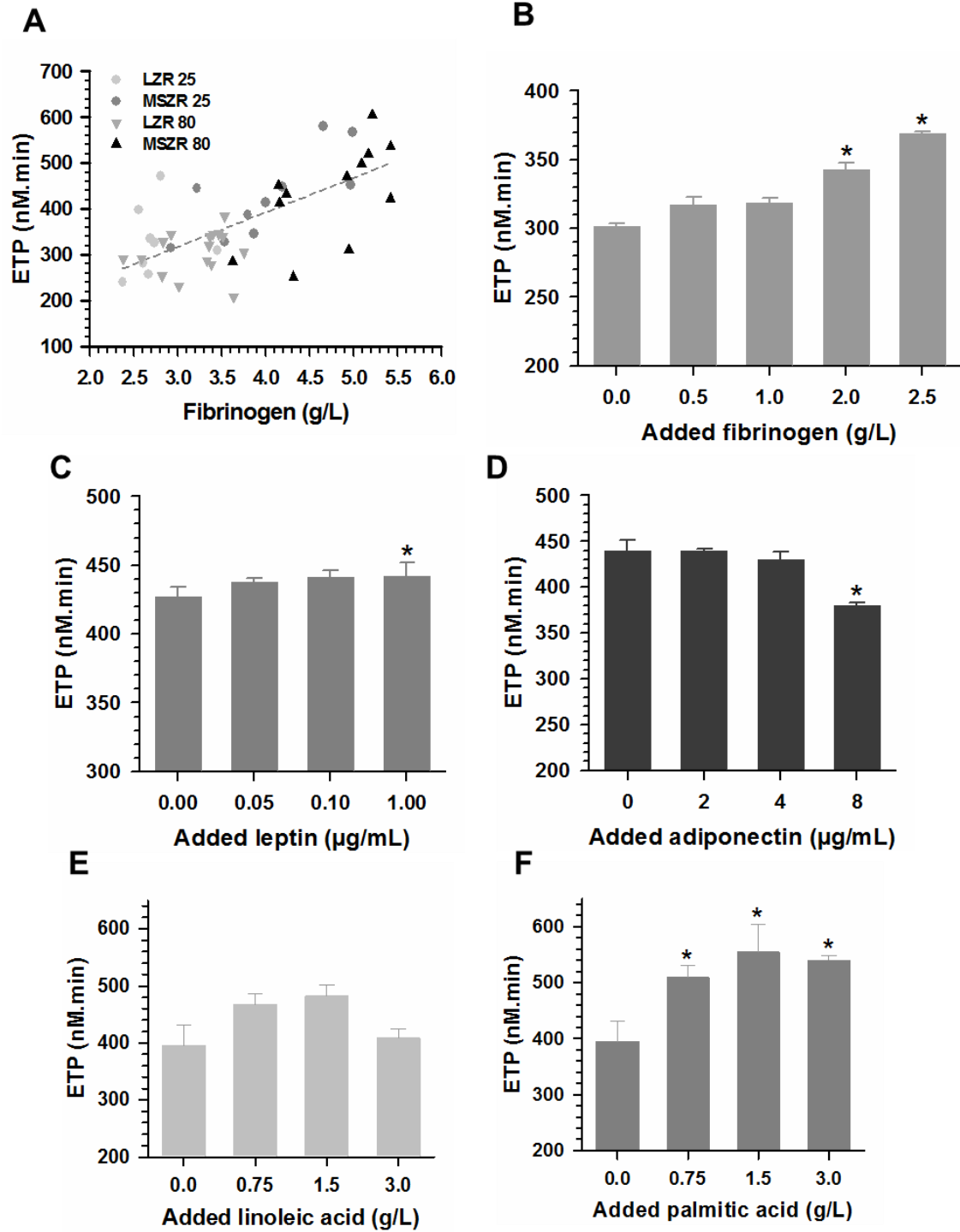


Figure 3

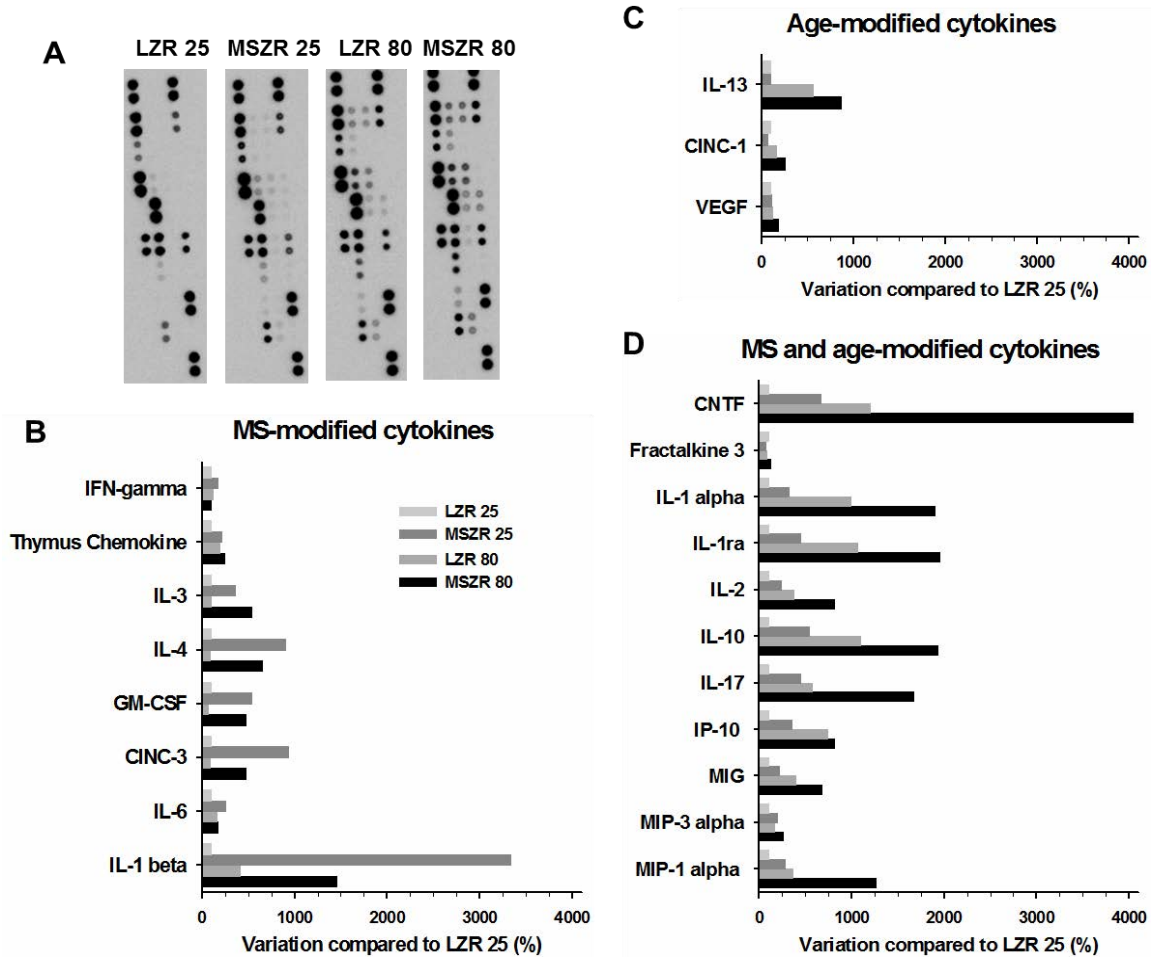
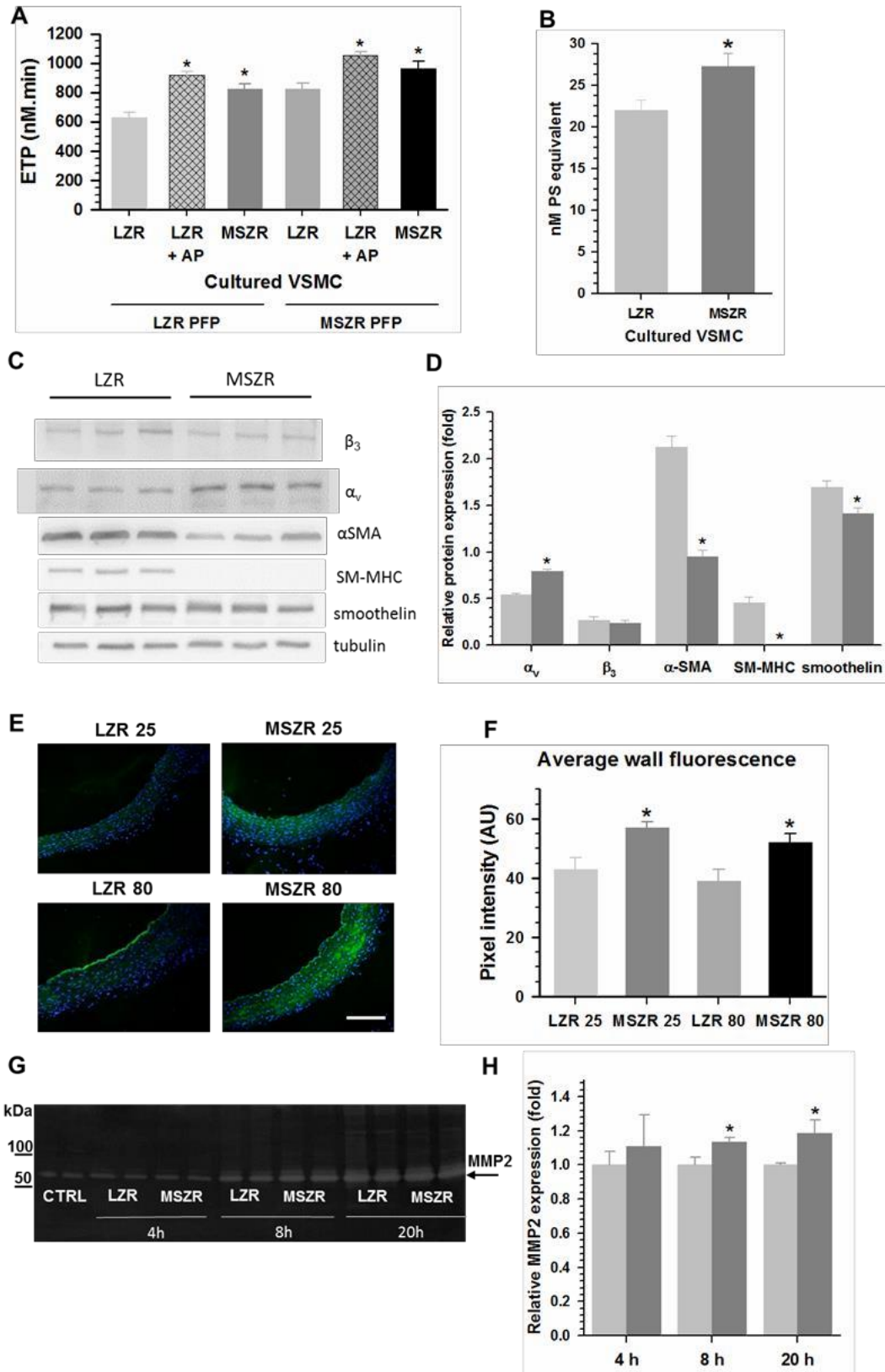


Figure 4



## IV. Discussion et conclusions

### 1) Phénotype prothrombotique de la paroi artérielle dans un contexte d'hypertension (SHR)

Nous avons démontré dans le modèle du rat SHR que les changements phénotypiques des CMLVs induits par l'hypertension sont responsables d'une augmentation de génération de thrombine au sein de la paroi artérielle qui est associé à une accélération de la formation de thrombus occlusif en réponse à une stimulation par du chlorure ferrique. La quantité plus importante de phospholipides chargés négativement à la surface des CMLVs des rats SHR et l'activité plus élevée du FT représentent deux mécanismes pouvant expliquer les propriétés procoagulantes de la paroi du rat SHR.

L'absence de phénotype hypercoagulable chez le rat SHR de 5 semaines et la prévention d'un tel phénotype par un traitement anti-hypertenseur sont deux arguments pour conclure que le profil prothrombotique de ces rats est bien induit par l'hypertension.

Cette augmentation de génération de thrombine tissulaire exerce également un effet prolifératif sur les CMLVs via le récepteur PAR-1 (protease-activated receptor 1).

L'hypertension artérielle provoque une modulation phénotypique des CMLVs qui a pour conséquences des modifications de la différenciation (Reusch *et al.* 1996), de la prolifération (Wilson *et al.*, 1993), de l'apoptose (Wernig *et al.*, 2003) et de la migration (von Offenberg Sweeney *et al.*, 2004). La thrombine via le récepteur PAR-1 est capable d'induire des processus de prolifération, d'apoptose et de migration des CMLVs. L'ensemble de nos résultats soulève la question de savoir si les changements phénotypiques des CMLVs dans un contexte d'hypertension sont la conséquence des effets cellulaires de la thrombine générée au sein de la paroi ou si l'hypertension exerce un rôle causal dans les états d'hypercoagulabilité impliquant les CMLVs. Bien que les CMLVs soient capables de générer de la thrombine lorsqu'elles sont dans un état non-apoptotique (Pathak *et al.*, 2006), les CMLVs servent de support cellulaire pour générer de la thrombine grâce à l'exposition de la PS en cas d'apoptose (Flynn *et al.*, 19). Il est donc très vraisemblable que ces différents processus surviennent dans un cercle vicieux.

#### - *Effet spécifique des CMLV dans la génération de thrombine*

Notre étude a montré que les valeurs d'ETP à la surface des CMLVs des rats SHR sont plus élevées que celles des rats Wistar tandis qu'il n'y a pas de différence au niveau des CE, ce qui suggère un rôle des CMLVs dans le phénotype prothrombotique de la paroi vasculaire observé avec les rats SHR. Nous

avons confirmé ce résultat en étudiant la génération de thrombine à la surface des anneaux aortiques des rats SHR et Wistar âgés de 12 semaines pour lesquels nous avons retiré l'endothélium ou l'adventice ou bien gardé uniquement la média. En effet, la génération de thrombine est plus élevée chez les rats SHR quel que soit le type d'anneaux, mettant en évidence la contribution majeure des CMLVs dans le phénotype prothrombotique.

Bien que les CMLVs aient la capacité de sécréter des microparticules enrichis en FT (Schechter *et al.*, 2000), il est peu probable que dans nos conditions expérimentales, la génération de thrombine soit influencée par ces microparticules car nous utilisons des CMLVs préalablement rincées.

Le rôle des cellules dans la coagulation est, dans un premier temps, d'apporter des surfaces phospholipidiques chargées négativement qui permettent la liaison des facteurs de coagulation *via* les résidus Gla et ont un rôle catalyseur des réactions enzymatiques de la cascade de coagulation. L'exposition de la phosphatidylsérine (PS) à la surface des plaquettes et des cellules de la paroi vasculaire est régulée par un mécanisme de flip-flop membranaire. Nos résultats ont montré que l'augmentation de l'activité procoagulante des phospholipides (PPA) à la surface des anneaux aortiques et des CMLVs des rats SHR pourrait expliquer l'augmentation de la génération de thrombine. Un des mécanismes pouvant expliquer cette augmentation de l'activité PPA est que l'hypertension augmente les taux de calcium intracellulaire favorisant ainsi le processus de flip-flop membranaire (Touyz *et al.*, 1999) et la réorganisation des membranes cellulaires des CMLVs des rats SHR (Morel *et al.*, 2011). De plus, l'effet de l'administration de périndopril chez le rat SHR sur la génération de thrombine à la surface des anneaux constitués de media seule peut s'expliquer par une diminution de l'activité PPA.

La génération de thrombine est initiée par le FT produit en excès par les cellules de la paroi lors de l'hypertension (Corseaux *et al.*, 2002). Nous avons observé une concentration en FT associée aux CMLVs très augmentée chez le rat SHR comparé au rat Wistar. Cette forte activité du FT des CMLVs en culture contraste avec un faible taux d'activité du TFPI et constitue un déséquilibre de la balance hémostatique en faveur des réactions procoagulantes.

- *Interaction des facteurs de coagulation avec la cellule : implication de récepteurs spécifiques*

Il a été montré que certains récepteurs spécifiques de la membrane régulent la formation des complexes de la coagulation en favorisant la colocalisation des facteurs de la coagulation à la surface des cellules (Monroe *et al.*, 2002). Une expression augmentée de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  dans la paroi des vaisseaux des rats SHR a été reportée dans une précédente étude (Intengan *et al.*, 1999). Un effet



synergique entre l'exposition de phospholipides chargés négativement, la synthèse de FT et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  sur la génération de thrombine dans le vaisseau du rat SHR est attendu car cette intégrine est le récepteur de la prothrombine à la surface des CMLVs (Stouffer *et al.*, 2003) et elle est impliquée dans la génération de thrombine à la surface de ces cellules (Mao *et al.*, 2012). Néanmoins, nous avons observé que l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est plus faible dans les CMLVs des rats SHR que dans celles des rats Wistar. Ceci est peut-être dû à une dédifférenciation des CMLVs primaires en culture. En effet, il a été établi que l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est liée à la différenciation des cellules (Dedhar *et al.*, 1991).

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des interactions GPIIb-VWF dans la formation du thrombus artériel (Denis *et al.*, 2007 ; Le behot *et al.*, 2014). En effet, le thrombus artériel commence par une interaction plaquette-plaquette impliquant les récepteurs GPIIb/IIIa et les interactions GPIIb-VWF qui précède la formation d'un réseau de fibrine qui stabilise le caillot plaquettaire. La formation de fibrine résulte de la génération de thrombine à la surface des CMLVs au niveau de la brèche vasculaire (Jackson *et al.*, 2011). La thrombine générée en quantité plus importante à la surface des CMLVs des rats SHR pourrait contribuer à la cinétique plus rapide de formation d'un thrombus occlusif chez le rat SHR par rapport aux rats Wistar, à la fois par ses effets d'activation des plaquettes via le récepteur PAR-1 et la formation d'un réseau de fibrine. Toutefois, nos résultats qui ne mettent pas en évidence de différence de réactivité plaquettaire entre les deux souches de rats ne sont pas en faveur d'un effet majeur de l'activation plaquettaire par la thrombine. Nos données montrant qu'un inhibiteur de la liaison GPIIb-VWF restore partiellement le flux sanguin dans la carotide du rat SHR alors qu'il n'a pas d'effet sur le thrombus non occlusif observé chez le rat Wistar est en accord avec la notion d'un processus hiérarchique dans la formation du thrombus occlusif (Stalker *et al.*, 2013) dans lequel (1) la formation du coeur du caillot implique principalement des ponts entre GPIIb/IIIa plaquettaires et (2) la partie externe du thrombus est constitué de plaquettes qui se lient par des interactions GPIIb-VWF une fois que le thrombus occlut 50 % de l'artère.

Nguyen *et al.*, ont montré que l'expression de PAR-1 est induite par un étirement cyclique (1 Hz, 20%) menant à une augmentation de la prolifération des CMLVs en réponse à la thrombine exogène (Nguyen *et al.*, 2001). L'interaction de la thrombine avec son récepteur PAR-1 dans les CMLVs permet à la thrombine d'exercer des effets cellulaires. Ainsi, l'augmentation de la génération de thrombine dans le vaisseau peut réguler plusieurs processus vasculaires impliqués dans l'hypertension tels que le tonus vasculaire ou la prolifération des CMLVs menant à l'augmentation de la pression pulsée et de la rigidité artérielle (Lacolley *et al.*, 2012 ; Borissof *et al.*, 2009). L'effet de la thrombine sur la prolifération des

CMLVs chez les rats SHR âgés de 5 et 12 semaines pourrait contribuer au remodelage vasculaire dans l'hypertension. Nos résultats ont montré que le mécanisme implique une augmentation de l'expression de PAR-1 et une activation de la voie de signalisation Akt (Mahajan *et al.*, 2012).

En conclusion, l'implication des CMLVs de la paroi vasculaire a un rôle majeur dans le dérèglement de la balance hémostatique lié à l'hypertension. Il est nécessaire d'étudier directement la paroi vasculaire pour identifier les déterminants cellulaires et moléculaires de la dérégulation de l'hémostase dans le but de mettre au point des stratégies adaptées telles que des inhibiteurs de la liaison GPIIb/IIIa-VWF ou un inhibiteur spécifique de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  pour cibler la génération de thrombine à la surface des cellules. Pour préciser le rôle éventuel de cette intégrine mais également pour étudier l'influence de l'âge et de l'inflammation vasculaire, nous avons poursuivi notre travail dans un modèle de syndrome métabolique, le rat Zucker (article 2)

## **2) Contribution des effets métaboliques et du vieillissement sur la génération de thrombine tissulaire et plasmatique (Zucker)**

Bien que le rat Zucker ne soit pas connu pour développer des pathologies thrombotiques, nos résultats ont montré que la génération de thrombine plasmatique et à la surface des CMLVs des rats Zucker obèses est augmentée comparée aux rats non-obèses. Cette étude nous a permis de confirmer le rôle des CMLVs dans la génération de thrombine tissulaire et de proposer des mécanismes communs à ceux identifiés dans notre première étude (rat SHR) mais également des mécanismes plus spécifiques des désordres métaboliques.

### *- Augmentation de la génération de thrombine à la surface des CMLVs*

Nous avons montré, dans l'étude précédente (rat SHR), que le phénotype pro-thrombotique était en partie dû à l'augmentation de la génération de thrombine à la surface des CMLVs (Ait-Aissa *et al.*, 2015). Comme pour le rat SHR, l'augmentation des propriétés procoagulantes des CMLVs des rats obèses peut s'expliquer par une plus forte proportion des phospholipides procoagulants à la surface externe des CMLVs des rats obèses.

### *- Modification de l'intégrine $\alpha_v$*

Un autre mécanisme pouvant expliquer cette augmentation de génération de thrombine à la surface des CMLVs est l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Cette sous-unité est impliquée dans la génération de thrombine à la surface des CMLVs (Mao *et al.*, 2012). Nous avons montré une augmentation de la sous-unité  $\alpha_v$  dans

les CMLVs des rats obèses qui pourrait participer à l'augmentation de génération de thrombine à la surface des CMLVs issue de rats obèses.

- *Modification du phénotype des CMLVs avec l'âge et l'hypertension*

Il est à noter que les marqueurs de différenciation des CMLVs sont très fortement diminués voire absents dans les cellules mises en culture à partir d'aorte de rats obèses. Ceci peut s'expliquer par la perte du phénotype contractile au profit d'un phénotype sécrétoire comme dans certaines pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose (Gomes *et al.*, 2012). S'il est probable que ce changement de phénotype peut avoir des conséquences sur la génération de thrombine, les mécanismes impliqués restent à identifier.

- *Effet des acides gras libres et de l'inflammation sur l'hypercoagulabilité des rats Zucker*

Nos résultats ont également montré que l'hypercoagulabilité des rats obèses observée dès la 25ème semaine pourrait être liée à une augmentation des acides gras libres et à une inflammation vasculaire. La quantité d'acides gras libres dans le sang est très fortement augmentée chez le rat Zucker obèse. En présence d'acide palmitique, la génération de thrombine à la surface des CMLVs des rats « lean » n'est pas différente de celle des rats obèses. Ainsi, nous avons montré pour la première fois que l'addition d'acide palmitique potentialise la génération de thrombine à la surface des CMLVs des rats Zucker lean.

Par ailleurs, l'augmentation des acides gras est associée à une augmentation des métalloprotéases (MMPs) dans les maladies liées au diabète de type 2 et à l'inflammation (Boden, 2008). Nous avons montré, dans notre modèle de rat Zucker, que l'activité de la gélatinase qui cible les MMP-2 et -9 est augmentée chez les rats obèses. Elles induisent, entre autres, une dégradation du collagène IV, de l'élastine, de la fibrine et de la laminine ce qui peut contribuer au remodelage vasculaire.

- *Altération de la fibrinolyse et augmentation de la réactivité plaquettaire chez le rats Zuker*

Nous avons montré une diminution de la fibrinolyse *in vitro* dès la 25ème semaine et une augmentation de la numération plaquettaire et de l'agrégation plaquettaire chez les rats Zucker. Ces données concernant l'agrégation des plaquettes corroborent ceux de la littérature dans laquelle Paul et coll ont montré que les rats Zucker diabétiques âgés de 12 semaines présentaient une agrégation plaquettaire *in vivo* augmentée couplé à une dysfonction endothéliale (Paul *et al.*, 2007).

Ces altérations de l'hémostase pourraient participer à l'accélération du vieillissement artériel et plus particulièrement à l'augmentation de la rigidité artérielle déclenchée par l'obésité et les désordres métaboliques (Sloboda et al 2012).

### **3) Conclusion générale (article 1 et 2)**

Ainsi, ces 2 articles ont montré qu'il existe un lien entre les altérations des CMLVs et les modifications de la génération de thrombine au sein de la paroi artérielle. La combinaison des deux modèles nous permet de suggérer fortement un rôle des phospholipides procoagulants à la surface des CMLVs dans l'augmentation de la génération de thrombine. Si nos expériences n'ont pas permis chez le rat SHR jeune (12 semaines) de mettre en évidence une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  à la surface des CMLVs nous l'avons montré dans le modèle du rat Zucker dès la 25<sup>ème</sup> semaine, associée à une augmentation de la génération de thrombine. Enfin, le modèle plus complexe du rat Zucker nous amène à suggérer un rôle des acides gras libres sur la génération de thrombine à la surface des CMLVs qui pourrait participer au caractère prothrombotique de la paroi artérielle dans ces pathologies.

Pour apporter des éléments de preuve supplémentaires, nous avons généré un modèle de souris invalidée pour la sous-unité  $\alpha_v$  dans les CMLs. Les résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

## Chapitre 2

**Rôle de la sous-unité  $\alpha_v$  des CMLVs sur le phénotype de la coagulation *in vitro* (génération de thrombine) et *in vivo* (modèles de saignement et de thrombose) chez la souris et caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux**

---

## **I. Intégrines $\alpha_v$ des cellules musculaires lisses vasculaires et génération de thrombine dans le compartiment sanguin et pariétal**

### **1) Rationnel et objectif de l'étude**

#### **a) Contexte de l'étude**

Les intégrines sont des récepteurs membranaires impliquées dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est exprimée fortement à la surface des CMLVs et faiblement à la surface des plaquettes. Elle est le seul récepteur identifié jusqu'à présent pour la prothrombine à la surface des CMLVs et sa fonction de mécanosenseur lui confère un rôle dans l'augmentation de génération de thrombine en réponse à des contraintes pulsatiles (Mao et al., 2012).

L'expression de cette intégrine dépend de l'état phénotypique des CMLVs, comme nous l'avons montré avec les CMLVs des rats Zucker, ce qui suggère qu'elle pourrait être impliquée dans l'athérombose. La thrombine augmente également l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  dans les CMLVs (Brown et al., 1994) et l'adhésion des plaquettes, probablement par l'activation de son récepteur PAR-1 (Stouffer and Smyth, 2003).

#### **b) Objectif de l'étude**

Notre hypothèse est qu'une augmentation du nombre d'interactions cellules-matrice extracellulaire augmente la rigidité artérielle et induit des modifications de la balance hémostatique. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  pourrait jouer un rôle majeur dans les propriétés mécaniques et dans l'hémostase du vaisseau de par son rôle dans l'adhésion des CMLVs à la matrice extracellulaire et de sa capacité à lier la prothrombine.

Notre objectif général était d'étudier le rôle de l'inactivation conditionnelle de la sous-unité  $\alpha_v$  dans les CMLVs sur la génération de thrombine dans le sang et/ou la paroi aortique et dans la formation du thrombus induit par l'application de  $\text{FeCl}_3$ .

Les différentes étapes étaient de déterminer :

- l'expression de la sous-unité  $\alpha_v$  dans les coupes tissulaires de souris invalidées pour cette intégrine au niveau des CMLVs afin d'évaluer la spécificité de cette délétion, ainsi que la réactivité plaquettaire par l'étude de l'agrégation en réponse à l'ADP, au collagène et à la thrombine et l'expression des glycoprotéines à la surface des plaquettes
- le rôle de cette intégrine sur la génération de thrombine au sein de la paroi artérielle et dans le compartiment sanguin
- la quantité de thrombine générée à la surface des CMLVs obtenues à partir de souris invalidées pour cette sous-unité  $\alpha_v$
- le rôle de l'intégrine dans la formation d'un thrombus induit par l'application de  $\text{FeCl}_3$ .

**c) Le modèle animal : modèle de souris invalidées de façon spécifique et inducible pour la sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines**

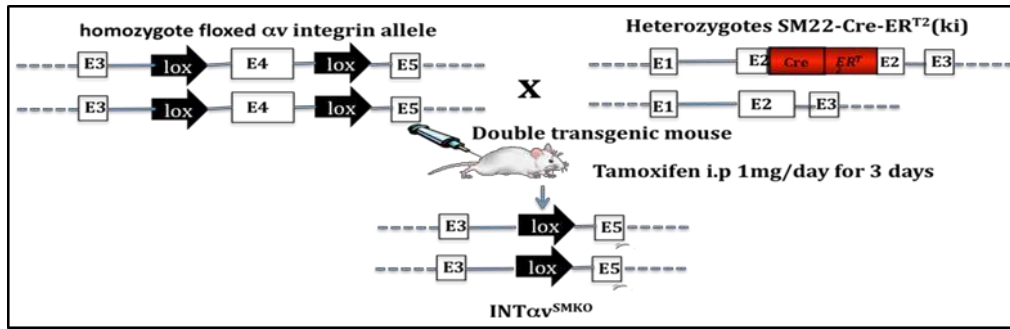
La sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines forme un dimère en se liant à une des 5 sous-unités  $\beta$  suivantes,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_5$ ,  $\beta_6$  et  $\beta_8$ . Ainsi, l'invalidation de la sous-unité  $\alpha_v$  entraîne une inhibition de la formation de ces 5 intégrines. Les souris invalidées pour le gène de la sous-unité  $\alpha_v$  ne sont pas viables et meurent d'hémorragie, ce qui suggère un rôle primordial de cette intégrine dans l'hémostase.

Nous avons développé au sein de l'unité ce modèle de souris invalidées de façon spécifique et inducible pour la sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines dans les CMLVs (souris  $\alpha_v^{\text{CMLV}}$ ).

Les souris floxées pour la sous-unité  $\alpha_v$  ont été obtenues par le groupe d'Adam Lacy-Hulbert (Massachusetts General Hospital, Etats-Unis). Elles ont été croisées avec une lignée de souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre activée par le tamoxifène ( $\text{CreER}^{\text{T2}}$ ) sous le contrôle du promoteur SM22 spécifique des CMLVs (Kuhbandner et al., 2000) données par le Dr Li à Paris. Des souris double-transgéniques ( $\alpha_v^{\text{fl}}/\alpha_v^{\text{fl}} : \text{SM22-Cre}^{\text{T2}}$ ) ont été obtenues. La délétion du gène de l'intégrine est induite par l'injection de tamoxifène chez la souris adulte pendant trois jours consécutifs. L'administration de tamoxifène induit l'excision du transgène rapporteur loxP dans les CMLVs (**Figure 20**). Dans la suite de ce travail, ces souris seront nommées  $\alpha_v^{\text{SMKO}}$ .

## Chapitre 2 : Rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des CMLVs sur le phénotype de la coagulation et Caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux

Sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines et CMLVs : Introduction et rationnel de l'étude



**Figure 20 :** Schéma de la génération des souris invalidées pour la sous unité  $\alpha_v$  des intégrines dans les CMLVs



## 2) Résultats principaux (non publiés)

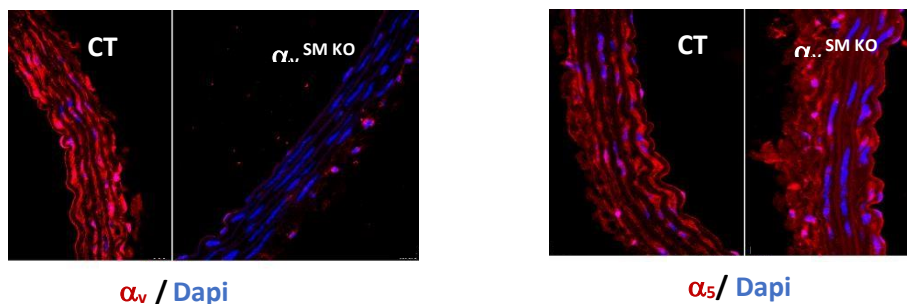
### a) Paramètres généraux

#### a.1 Vérification de l'expression de la sous-unité $\alpha_v$ dans la carotide et dans les CMLVs

Afin de vérifier respectivement l'efficacité et la spécificité de l'invalidation de la sous-unité  $\alpha_v$ , l'expression des sous-unités  $\alpha_v$  et  $\alpha_5$  (**Figure 21**) qui est également présente dans les CMLVs, a été recherchée par immunohistochimie sur une coupe transversale de carotide de souris invalidée de façon conditionnelle et spécifique dans les CMLVs (souris âgées de 3 mois, images obtenues 15 jours après l'invalidation).

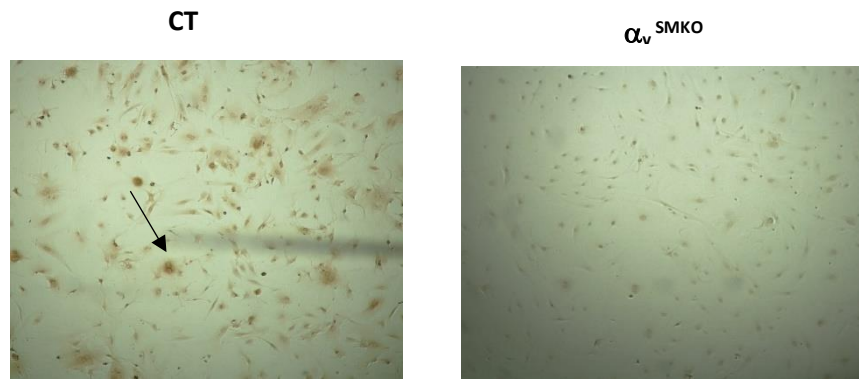
Les deux intégrines apparaissent en rouge et les noyaux des cellules, marqués au DAPI, apparaissent en bleu. La sous-unité  $\alpha_v$  est quasi-absente dans la coupe de carotide de la souris  $\alpha_v^{\text{SMKO}}$  au niveau de la média par rapport à la souris contrôle (CT). L'intégrine  $\alpha_5$  n'est pas modifiée chez la souris invalidée par rapport à la souris CT.

Ainsi, le taux d'invalidation de  $\alpha_v$  est très satisfaisant (60% environ, résultat confirmé en PCR), spécifique des CMLVs et de la sous unité  $\alpha_v$ .



**Figure 21** : Immunohistochimie pour les sous unités  $\alpha_v$  (en rouge à gauche) et  $\alpha_5$  (en rouge à droite) des intégrines dans une coupe de carotide de souris invalidées ( $\alpha_v^{\text{SMKO}}$ ) ou non (CT) pour  $\alpha_v$ . Les noyaux des cellules apparaissent en bleu après un marquage au DAPI.

Le taux d'invalidation de la sous unité  $\alpha_v$  a été vérifié par immunocytochimie dans les CMLVs mises en culture à partir d'aortes de souris. (**Figure 22**). La coloration brune indique la présence de la sous unité  $\alpha_v$ . Cette sous-unité est exprimée fortement par les CMLVs issues de souris CT mais très faiblement par les CMLVs issues de souris invalidées.



**Figure 22** : Immunocytochimie de la sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines à la surface de CMLVs mises en culture à partir d'aortes de souris contrôles (CT) et invalidées ( $\alpha_v^{\text{SMKO}}$ ). Grossissement x 40

### a.2 Réactivité plaquettaire

Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'invalidation d' $\alpha_v$  ne modifiait pas la numération sanguine. La numération sanguine des souris invalidées pour la sous-unité  $\alpha_v$  a été mesurée sur du sang anticoagulé par du citrate et donc dilué à 10%. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3** : Numération sanguine des souris invalidées et des souris contrôles.

	Mâles			Femelles		
	CT n = 12	$\alpha_v^{\text{SMKO}}$ n = 12	P	CT n = 11	$\alpha_v^{\text{SMKO}}$ n = 7	P
Erythrocytes, $\times 10^{12}/L$	6,7 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,1	0,22	6,7 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,2	0,59
Leucocytes, $\times 10^9/L$	6,7 $\pm$ 0,7	6,7 $\pm$ 0,5	1,00	5,5 $\pm$ 0,8	7,3 $\pm$ 1,0	0,17
Plaquettes, $10^9/L$	666 $\pm$ 51	629 $\pm$ 46	0,60	500 $\pm$ 48	533 $\pm$ 54	0,66
Hématocrite, %	35,1 $\pm$ 1,2	34,3 $\pm$ 1,4	0,69	30,9 $\pm$ 1,4	31,4 $\pm$ 1,2	0,83
Hémoglobine, g/dL	11,2 $\pm$ 0,6	10,7 $\pm$ 0,4	0,50	10,5 $\pm$ 0,4	10,4 $\pm$ 0,4	0,92
VPM, fL	6,7 $\pm$ 0,4	6,2 $\pm$ 0,2	0,30	6,8 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,2	0,52

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM (Erreur Standard à la Moyenne). VPM : Volume Plaquettaire Moyen.

Comme attendu pour une invalidation spécifique des CMLVs qui ne touche pas les cellules souches hématopoïétiques, le nombre d'érythrocytes, l'hématocrite, l'hémoglobine, la numération et le volume plaquettaire ainsi que le compte global de leucocytes ne sont pas modifiés entre les souris CT et les souris  $\alpha_v^{\text{SMKO}}$ . De plus, le sexe n'a pas d'influence entre les deux groupes de souris.

## Chapitre 2 : Rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des CMLVs sur le phénotype de la coagulation et Caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux

Sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines et CMLVs : Résultats principaux (non publiés)

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est exprimée à la surface des plaquettes mais en faible quantité par rapport à l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . L'expression de cette intégrine et l'agrégation plaquettaire ont été mesurées à partir du sang de souris  $\alpha_v^{\text{SMKO}}$  et de souris CT afin de vérifier la spécificité du site cellulaire de l'invalidation.

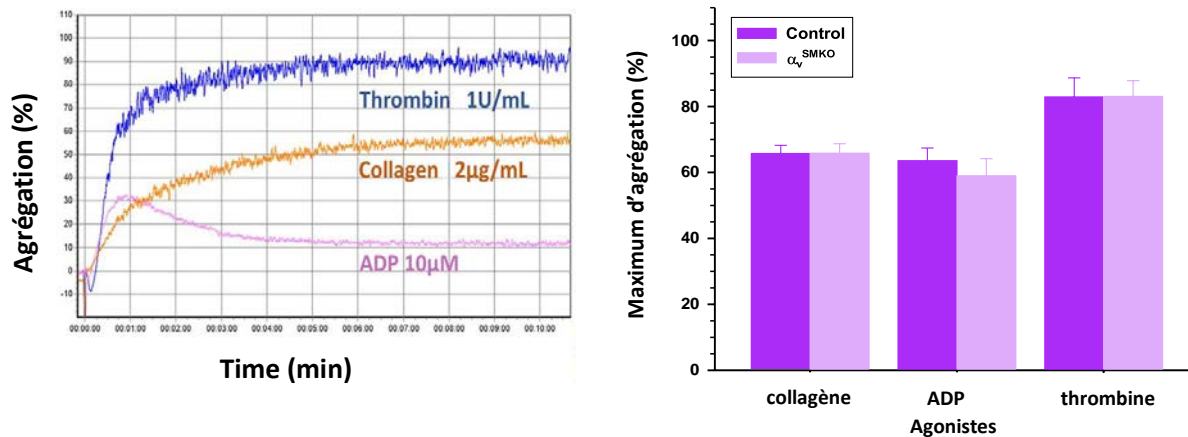
L'expression des glycoprotéines membranaires des plaquettes a été étudiée par cytométrie en flux et est présentée dans le **Tableau 4**. Aucune différence d'expression de ces glycoprotéines membranaires n'a été mise en évidence entre les souris  $\alpha_v^{\text{SMKO}}$  et les souris CT.

**Tableau 4** : Expression des glycoprotéines plaquettaires.

	Intensité moyenne de fluorescence		
	CT n = 4	$\alpha_v^{\text{SMKO}}$ n = 4	P
CLEC-2	82 ± 18	62 ± 18	0,47
GPIb	31 ± 4	31 ± 4	0,90
GPIX	79 ± 7	71 ± 11	0,57
GPV	4,0 ± 1,0	3,4 ± 0,8	0,64
CD9	118 ± 14	123 ± 27	0,89
$\alpha_2$	5,2 ± 0,7	5,3 ± 0,2	0,87
$\beta_1$	29 ± 2	27 ± 2	0,55
$\alpha_{IIb}\beta_3$	44 ± 2	33 ± 7	0,28
$\alpha_v\beta_3$	92 ± 15	70 ± 2	0,22

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ESM. GP : glycoprotéine.

L'agrégation plaquettaire a été étudiée en plaquettes lavées resuspendues en tampon Tyrode et ajustées à 200 G/L (**Figure 23**). Les agonistes utilisés ont été le collagène à 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , l'ADP à 10  $\mu\text{M}$  ou la thrombine à 1 U/mL car ce sont des agonistes forts (collagène et thrombine) ou faible (ADP) qui activent différentes voies de signalisation intracellulaire. La **Figure 23** présente à gauche un profil typique d'agrégation obtenu avec ces agonistes. La diminution de la transmission de lumière observée juste après l'addition des agonistes correspond au changement de forme (1<sup>ère</sup> étape d'activation) des plaquettes qui deviennent plus étalées avec la formation de pseudopodes. L'agrégation plaquettaire est irréversible pour le collagène et la thrombine alors qu'elle est réversible avec l'ADP. Il n'y a pas de différence entre les souris invalidées et les souris contrôles pour les différents paramètres mesurés.



**Figure 23 : Agrégation plaquettaire.** Courbes d'agrégation plaquettaire (panel de gauche) en réponse à une stimulation par 1 U/ml de thrombine, 2  $\mu$ g/ml de collagène ou 10  $\mu$ M d'ADP. Les valeurs d'agrégation maximale des plaquettes sont présentées sur le panel de droite (n=10). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM.

Ces résultats nous permettent de conclure que l'invalidation conditionnelle de la sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines dans les CMLVs n'affecte pas son expression et sa participation à l'agrégation sur les plaquettes, ce qui confirme la spécificité cellulaire de l'invalidation réalisée.

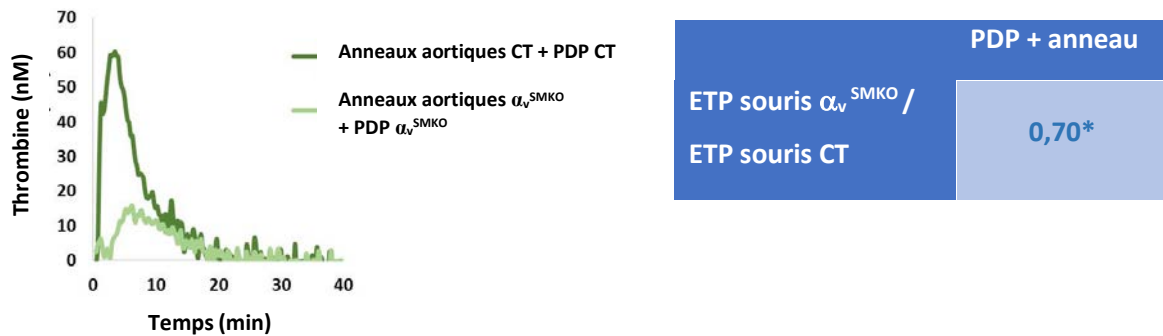
## b) Etude de la coagulation *in vitro* des souris invalidées pour la sous unité $\alpha_v$

La mesure de la génération de thrombine par thrombinographie permet de quantifier la conversion de la prothrombine en thrombine en déclenchant la voie extrinsèque de la coagulation. Notre but était de déterminer le rôle de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  des CMLVs dans la génération de thrombine tissulaire et sanguine.

### b.1 Génération de thrombine en présence d'anneaux aortiques

La génération de thrombine a été enregistrée à la surface d'anneaux aortiques de 2 mm pour étudier la capacité de la paroi vasculaire entière (intima, media et adventice) à générer de la thrombine. Afin d'avoir uniquement la contribution cellulaire de la paroi, les expériences ont été réalisées en plasma dépourvu en plaquette. Les anneaux d'une aorte de souris sont incubés avec le plasma pauvre en plaquettes issu de cette même souris.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 24**.

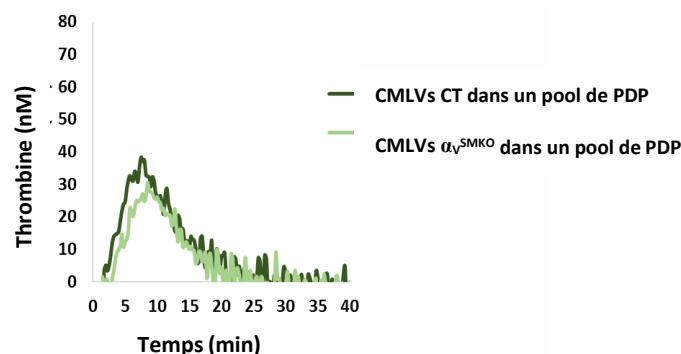


**Figure 24 : Génération de thrombine à la surface d'anneaux aortiques de souris invalidées et contrôles.** Courbe représentative de génération de thrombine au cours du temps (panel de gauche) et valeur d'ETP (tableau à droite) à la surface d'anneaux aortiques de souris  $\alpha_v^{SMKO}$  et CT ajoutés dans le plasma de la même souris. Les résultats sont exprimés en ratio de l'ETP pour les souris  $\alpha_v^{SMKO}$  sur l'ETP des souris CT. \*P < 0,05, souris  $\alpha_v^{SMKO}$  vs souris CT (n=10) ETP : endogenous thrombin potential. PDP : plasma dépourvu en plaquettes.

Ces résultats montrent que la génération de thrombine est diminuée chez les souris  $\alpha_v^{SMKO}$  par rapport à leurs contrôles.

### b.2 Génération de thrombine à la surface des CMLVs

Pour évaluer l'implication des CMLVs dans le phénotype observé précédemment avec les anneaux aortiques, la génération de thrombine a été suivie à la surface de CMLVs mises en culture à partir d'aortes de souris  $\alpha_v^{SMKO}$  ou CT (**Figure 25**) en utilisant un pool de PDP de souris CT pour s'affranchir de la participation des plaquettes et des variations individuelles de génération de thrombine liées aux facteurs plasmatiques et donc d'étudier l'influence propre des cellules.



**Figure 25 : Génération de thrombine à la surface des CMLVs.** Courbes représentatives de la génération de thrombine à la surface des CMLVs mises en culture à partir d'aortes de souris  $\alpha_v^{SMKO}$  et CT. La génération de thrombine a été mesurée en utilisant un pool de PDP de souris CT.

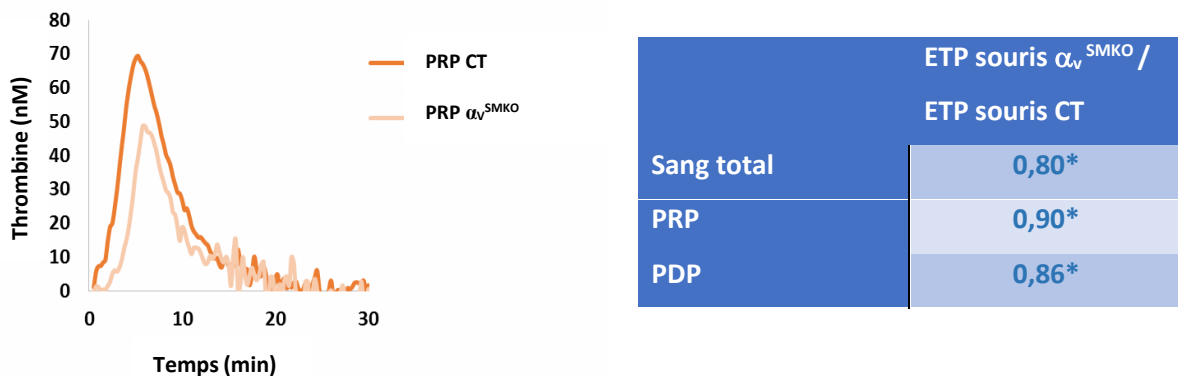
La génération de thrombine à la surface des CMLVs de souris  $\alpha_v^{SMKO}$  est diminuée de 10 % par rapport aux CMLVs de souris CT. Ce résultat indique que la sous unité  $\alpha_v$  exprimée par les CMLVs est partiellement impliquée dans la génération de thrombine tissulaire.

### b.3 Génération de thrombine en sang total et en plasma riche ou pauvre en plaquettes

Afin d'évaluer si la diminution de la génération de thrombine observée avec les anneaux des souris  $\alpha_v^{SMKO}$  était également observée dans le sang de ces souris, celle-ci a été mesurée en sang total.

Dans le sang total, les expériences ont été réalisées en ajoutant ou non du FT car les monocytes apportent du FT dans le milieu réactionnel. Le tableau de la **Figure 26** montre une diminution significative de l'aire sous la courbe de génération de thrombine dans le sang total de souris  $\alpha_v^{SMKO}$  par rapport au sang de souris CT.

Pour déterminer si cette modification est due aux plaquettes, la génération de thrombine a été également mesurée en plasma riche en plaquettes (PRP ajusté à 200 G/L) et en plasma dépourvu de plaquettes (PDP). Le panel de gauche de la **Figure 26** montre des courbes typiques de génération de thrombine pour les deux groupes de souris dans du PRP.



**Figure 26 : Génération de thrombine dans le sang total, le PRP et le PDP de souris invalidées et contrôles.** Panel de gauche : courbes représentatives de génération de thrombine en plasma riche en plaquettes (PRP). Panel de droite : valeurs d'ETP (endogenous thrombin potential) dans le sang total, le PRP et le plasma dépourvu de plaquettes (PDP) de souris  $\alpha_v^{SMKO}$  et CT. Les résultats sont exprimés en ratio de l'ETP moyen pour la souris invalidée sur l'ETP moyen pour la souris contrôle. \*P < 0,05, souris  $\alpha_v^{SMKO}$  vs souris CT.

La diminution significative de l'ETP dans le PDP et le PRP des souris  $\alpha_v^{SMKO}$  par rapport aux souris CT (**Figure 26**) est surprenante puisqu'il n'y a pas de modification de l'expression d' $\alpha_v$  dans les plaquettes.

## Chapitre 2 : Rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des CMLVs sur le phénotype de la coagulation et Caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux

Sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines et CMLVs : Résultats principaux (non publiés)

Ce résultat suggère que la modification d'expression de cette intégrine au niveau des CMLVs a un retentissement sur la synthèse par les cellules vasculaires de facteurs de coagulation qui traversent la barrière endothéliale et vont réguler la génération de thrombine plasmatique, comme la TM et le TFPI.

### b.4 Dosage des facteurs anticoagulants dans le plasma de la souris

Les concentrations de la forme soluble de la TM et l'activité du TFPI, qui ont des propriétés anticoagulantes sont présentés dans le **Tableau 5**.

**Tableau 5** : Taux de Thrombomoduline (TM) soluble et activité du TFPI dans le plasma de la souris  $\alpha_v$ <sup>SMKO</sup> ou CT

	CT n = 16	$\alpha_v$ <sup>SMKO</sup> n = 15	P
sTM (pg/mL)	6861 ± 453	8316 ± 754	0,11
TFPI (U/mL)	1,85 ± 0.3	2,72 ± 0.35	0,07

Les résultats sont exprimés en moyenne ± ESM.

La concentration en TM soluble et l'activité TFPI ont une tendance à être augmentées chez la souris  $\alpha_v$ <sup>SMKO</sup> par rapport à la souris CT, ce qui serait en accord avec une contribution de la paroi sur la génération de thrombine diminuée dans le compartiment sanguin de la souris  $\alpha_v$ <sup>SMKO</sup> si ce résultat était confirmé sur un nombre plus important d'animaux.

### c) Implication de la sous-unité $\alpha_v$ dans la coagulation *in vivo* : modèle de thrombose carotidienne des souris invalidées pour $\alpha_v$ et traitées à l'angiotensine II

Un modèle de thrombose par application de chlorure ferrique sur la carotide droite a été mis au point comme présenté dans la partie « matériel et méthodes ». Les résultats obtenus avec les souris à l'état basal n'ont pas permis de mettre en évidence de différences dans la cinétique de formation du thrombus entre les souris  $\alpha_v$ <sup>SMKO</sup> et les souris CT.

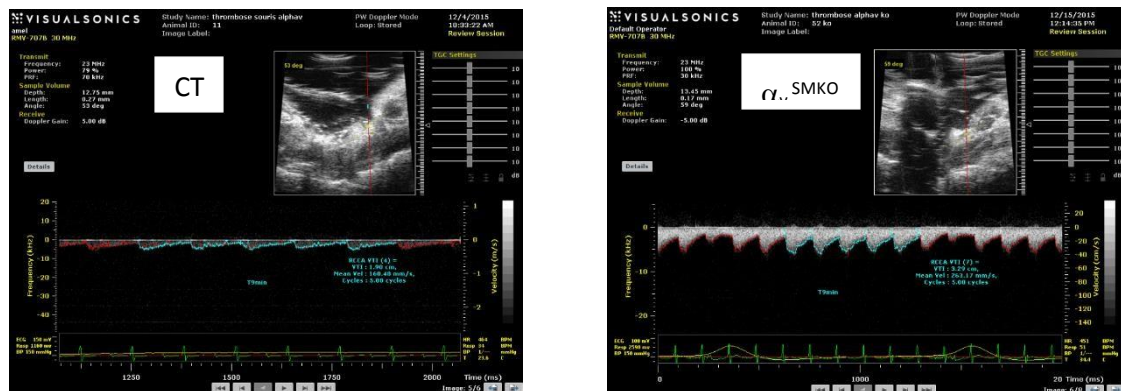
En lien avec notre démonstration d'une accélération de la survenue d'un thrombus occlusif avec l'hypertension artérielle (modèle du rat SHR), nous avons traité les souris par de l'angiotensine II. Les souris ont reçu une administration d'angiotensine II, à raison de 1,5 mg/kg/jour, pendant 28 jours à

## Chapitre 2 : Rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des CMLVs sur le phénotype de la coagulation et Caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux

### Sous-unité $\alpha_v$ des intégrines et CMLVs : Résultats principaux (non publiés)

l'aide de minipompes implantées en sous-cutané. Cette dose d'angiotensine II induit une augmentation de pression artérielle de l'ordre de 20 mmHg.

L'échographie en mode-M des carotides permet de visualiser le flux sanguin dans la carotide droite de la souris avant et après l'application du  $\text{FeCl}_3$ . Des profils typiques du flux sanguin au cours du temps obtenus pour les deux groupes de souris sont présentés sur la **Figure 27**.



**Figure 27** : Mesures échographiques du flux sanguin dans la carotide droite de la souris après application de  $\text{FeCl}_3$  à 7,5 % pendant 2 min.

Le temps moyen de formation d'un thrombus occlusif (diminution de plus de 90 % du flux sanguin pendant au moins 1 min) et le poids moyen du thrombus carotidien sont présentés dans le **Tableau 6**.

**Tableau 6** : Temps moyen d'occlusion de la carotide et poids moyen du thrombus en réponse à l'application de  $\text{FeCl}_3$ .

	CT	$\alpha_v^{\text{SMKO}}$	P
	n = 12	n = 11	
Temps d'occlusion (min)	7,92 ± 0,4	9,44 ± 1,08	0,2
Poids du thrombus ( $\mu\text{g}$ )	3,6 ± 2,0	1,0 ± 0,3	0,2

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM.

Nous avons observé une tendance à un allongement du temps moyen de formation d'un thrombus occlusif pour les souris  $\alpha_v^{\text{SMKO}}$  par rapport aux souris CT (**Tableau 6**). Le poids moyen du thrombus carotidien semble moins élevé pour les souris  $\alpha_v^{\text{SMKO}}$  que pour les souris CT. Cependant, ces résultats n'atteignent pas la significativité statistique et les expériences nécessitent d'être reproduites avec un



plus grand nombre d'animaux pour affirmer que l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  contribue significativement à la formation d'un thrombus artériel dans un contexte d'HTA.

### 3) Discussion et conclusion

Nous avons montré par immunohistochimie que l'invalidation de la sous-unité  $\alpha_v$  dans notre modèle de souris est bien tissu-spécifique. En effet, le marquage de cette sous-unité est quasiment absent dans les coupes de carotides de souris invalidées et ceci sans modification de la sous-unité  $\alpha_5$ . L'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  est la principale intégrine impliquée dans les adhésions focales. Ainsi, l'invalidation n'affecte pas les autres récepteurs membranaires impliqués dans les interactions cellules-matrice extracellulaire.

De plus, nous avons montré que l'expression des glycoprotéines plaquettaires et l'agrégation plaquettaire en réponse à trois agonistes (collagène, ADP et thrombine) n'étaient pas modifiées chez les souris  $\alpha_v^{SMKO}$ . Ce résultat montre que l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  sur les plaquettes n'est pas influencée par la délétion tissu-spécifique dans les CMLVs confirmant la spécificité de cette invalidation. Cette absence de modification de réactivité plaquettaire pourrait être expliquée également par une présence de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  à la surface des plaquettes en beaucoup plus faible proportion que celle de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  et donc un rôle mineur dans l'agrégation.

Nous avons évalué la réactivité du système de la coagulation *in vitro*, en utilisant la technique de thrombinographie en sang total, en PRP, et en plasma pauvre en plaquettes (PDP) en présence ou non d'anneaux artériels. Nous avons montré que la génération de thrombine est diminuée dans le compartiment sanguin et pariétal des souris  $\alpha_v^{SMKO}$ . Le résultat obtenu dans le compartiment pariétal est attendu car l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est un récepteur de la prothrombine au niveau des CMLVs. La présence de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  sous sa forme activée permet à la prothrombine d'adhérer à la surface des CMLVs (Byzova and Plow, 1998; Dardik et al., 2002). En synthétisant le FT et en concentrant la prothrombinase à la surface de sa membrane qui externalise des phospholipides anioniques (Flynn et al., 1997; Pathak et al., 2006) la CMLVs apportent les différents éléments qui favorisent la transformation de la prothrombine en thrombine au sein de la paroi artérielle.

Par ailleurs, nous avons observé que la génération de thrombine était également diminuée dans le compartiment sanguin, que ce soit en sang total, en plasma riche ou pauvre en plaquettes. Ce résultat est plus inattendu et soulève la question du ou des mécanismes qui peuvent expliquer qu'une modification d'une intégrine au niveau pariétal ait une conséquence sur le compartiment sanguin.

## Chapitre 2 : Rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des CMLVs sur le phénotype de la coagulation et Caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux

### Sous-unité $\alpha_v$ des intégrines et CMLVs : Discussion et conclusion

---

Nous avons observé une diminution similaire de la génération de thrombine entre souris invalidées et contrôles avec du plasma pauvre et riche en plaquettes, ce qui suggère que cette diminution ne dépend pas ou peu des plaquettes. Ce résultat est d'ailleurs en accord avec l'absence de différence de réactivité plaquettaire entre les 2 souches.

Par ailleurs, nous avons réalisé, en parallèle, la mise en culture de CMLVs issues de la média de ces souris sur lesquelles nous avons réalisé des expériences de génération de thrombine. Les premiers résultats semblent conforter nos résultats sur anneaux d'aortes à savoir que les CMLVs des souris  $\alpha_v^{SMKO}$  génèrent moins de thrombine que les CMLVs des souris contrôles. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus à la surface des anneaux aortiques et met l'accent sur le rôle des CMLVs dans la génération de thrombine en présence des anneaux comme nous l'avons montré notre étude chez le rat SHR (Ait Aissa et al., 2015) et apporte une explication mécanistique pour nos données avec les CMLVs de rats Zucker qui montrent une augmentation de génération de thrombine associée à une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

De nombreux échanges existent entre le compartiment vasculaire et le sang dont la sécrétion de molécules pro- ou anti-coagulantes synthétisées par les cellules de la paroi. Les expériences menées pour apporter une explication à cette modification plasmatique ont ciblé dans le plasma la TM et le TFPI qui sont deux molécules inhibitrices de la coagulation synthétisées à la fois par les CMLVs et les CE. Nos premiers résultats mettent en évidence une tendance à une augmentation de ces molécules dans le plasma des souris  $\alpha_v^{SMKO}$ .

Une des hypothèses est qu'une modification des intégrines à la surface des CMLVs entraîne une modulation phénotypique des CMLVs responsable d'une modification des connections entre CMLVs et CE et donc une plus grande perméabilité endothéliale aux molécules anticoagulantes synthétisées par les CMLVs. Ainsi ces molécules seraient relarguées en plus grande quantité dans le plasma par conductance radiale (Michel et al., 2007). La modification de connections entre les CMLVs et CE qui augmenterait la perméabilité peut être dû à une modification de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine qui a un rôle dans l'adhésion et la signalisation cellulaire (Shang et al., 2014).

Nous avons également étudié un modèle intégratif de thrombose artérielle *in vivo*, avec le modèle de thrombose carotidienne induite par du  $FeCl_3$ . Chez les souris  $\alpha_v^{SMKO}$ , le temps nécessaire à la formation du thrombus n'est pas modifié comparativement aux souris contrôles. Néanmoins, après un traitement par l'angiotensine II, le temps d'occlusion apparaît prolongé comparativement à la souris contrôle. Ceci suggère que dans un contexte d'hypertension induite par Ang-II, la délétion de la sous-unité  $\alpha_v$  dans les CMLVs a un effet protecteur.

## Chapitre 2 : Rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des CMLVs sur le phénotype de la coagulation et Caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux

### Sous-unité $\alpha_v$ des intégrines et CMLVs : Discussion et conclusion

---

En conclusion, nous avons mis en évidence un phénotype hypocoagulable dans le compartiment sanguin et à la surface d'anneaux aortiques de la souris invalidée pour la sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines dans les CMLVs. L'ensemble de ces résultats met en évidence un rôle de cette intégrine des CML dans la génération de thrombine à la surface aortique et dans le sang ainsi que dans la formation d'un thrombus artériel.

## II. Caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux

Les résultats obtenus dans la partie précédente soulignent l'implication de la sous unité  $\alpha_v$  tant dans la coagulation *in vitro* que dans la coagulation *in vivo*. Ainsi, il serait intéressant de développer des glycopeptides radio-marqués contenant une séquence RDG capables de se lier aux intégrines d'intérêt. Ceci permettrait de localiser les intégrines *in vivo* dans diverses circonstances pathologiques, en particulier les thrombophilies acquises liées au vieillissement, l'HTA ou le syndrome métabolique où les contraintes mécaniques exercées sur la paroi sont le plus souvent augmentées et donc susceptibles d'augmenter l'expression de cette intégrine. Un autre intérêt serait de développer ces peptides pour bloquer l'intégrine d'intérêt afin d'inhiber son activité. C'est dans ce contexte que ce travail a été initié.

### 1) Rationnel et objectif de l'étude

#### a) Contexte de l'étude

L'imagerie moléculaire, en particulier l'imagerie par tomographie par émission de positons (TEP) est devenue indispensable au diagnostic de nombreuses maladies. L'essor de ces techniques non invasives est lié à la possibilité d'obtenir des images tridimensionnelles de traceurs faiblement radioactifs permettant de localiser et quantifier des cibles ou des processus pathologiques spécifiques. A cet égard, les radioéléments, comme le fluor-18 ( $^{18}\text{F}$ ) sont des sondes de choix pour l'acquisition d'images par des caméras TEP. Quelques exemples dans la littérature montrent que l'incorporation d'un sucre sur ces biomolécules permet généralement d'augmenter leur biodisponibilité et donc d'améliorer le diagnostic par imagerie TEP (Bhattasharyya *et al.*, 2012 ; Chapleur *et al.*, 2013). Il est donc intéressant de proposer de nouvelles molécules à base de sucres pouvant être utilisées comme groupes prosthétiques permettant d'obtenir un radiomarquage plus aisé des biomolécules par une technique de ligation très performante.

En collaboration avec l'équipe du Pr. Yves Chapleur et la plateforme d'imagerie moléculaire NancyCloTep, l'étude a ciblé la caractérisation de l'effet de peptides contenant un motif RGD (Arg-Gly-Asp) qui se lie à certaines intégrines telles que l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  ou  $\alpha_{11b}\beta_3$  et un groupement glucidique marqué ou non au  $^{18}\text{F}$  sur des fonctions cellulaires dépendantes des sous-unités  $\beta_3$  des intégrines dans le but de développer de nouveaux radiotraceurs d'imagerie *in vivo*. Notre hypothèse était que des glycopeptides fluorés contenant la séquence RGD et un ou deux acides aminés adjacents sélectionnés pourraient se fixer de façon sélective à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et permettre ainsi de détecter des variations

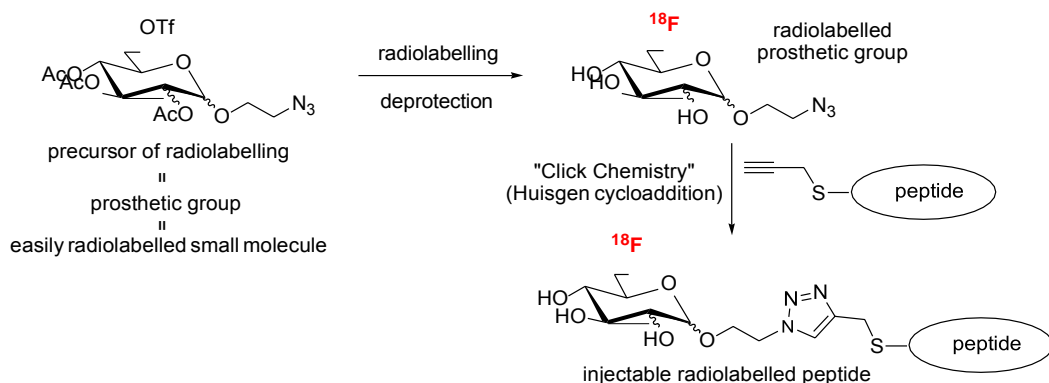
d'expression et de distribution de cette intégrine dans la paroi artérielle dans des pathologies cardiovasculaires.

L'application des RGD fluorés dans l'imagerie est fréquente dans le cadre de la recherche en oncologie pour localiser les cellules cancéreuses ou l'angiogenèse (Beer and Schwaiger, 2008). Dans un modèle tumoral, l'expression d'intégrines est bien corrélée avec l'accumulation de traceur  $^{18}\text{F}$  galacto-RGD (Haubner et al., 2005). Ces peptides présentent également un intérêt dans le cadre de pathologies cardiovasculaires, en particulier pour visualiser la plaque d'athérosclérose (Rudd et al., 2002). Dans les tests *in vivo*, les peptides RGD couplés avec un élément radioactif peuvent bien se fixer spécifiquement à leurs récepteurs.

### b) Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse met en œuvre un groupe prosthétique glucidique marqué avec un atome de  $^{18}\text{F}$  faiblement radioactif qui permet d'obtenir des images tridimensionnelles de ces traceurs. Ce précurseur radiomarqué est couplé avec un peptide contenant une séquence RGD grâce à la cycloaddition de Huisgen qui met en jeu un azoture et un alcyne vrai en présence de cuivre (**Figure 28**).

Huit glycopeptides ont été synthétisés par cette technique (7 linéaires et 1 cyclique) dont 4 marqués au  $^{18}\text{F}$ .



**Figure 28:** Synthèse de glycopeptides marqués au Fluor-18

**c) Objectif de l'étude**

L'objectif de mon travail a été de comparer l'efficacité de ces glyco"RGD" radiomarqués ou non à celle de 4 peptides de références RGD, RGDC, cRGDfV et cRGDfC en termes d'inhibition de l'agrégation plaquettaire en réponse à différents agonistes (ADP, collagène et thrombine).

Notre stratégie comportait également deux autres étapes qui n'ont pas été incluses dans l'article.

La première étape était destinée à évaluer l'effet des peptides sélectionnés sur l'adhérence de CMLVs à la vitronectine et la génération de thrombine à la surface des CMLVs.

La deuxième étape consistait à évaluer ces glyco"RGD" *in vivo* par imagerie TEP afin de montrer leur efficacité pour le diagnostic de tumeurs.

## 2) Effet des peptides RGD sur l'agrégation plaquettaire (Article 3)

### a) 'Click' glycosylation of peptides through cysteine propargylation and CuAAC (publié dans Bioorg.and Med. Chem.)

Bioorganic & Medicinal Chemistry 22 (2014) 6672–6683



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmc](http://www.elsevier.com/locate/bmc)



## 'Click' glycosylation of peptides through cysteine propargylation and CuAAC



Sandrine Lamandé-Langle<sup>a,b,\*</sup>, Charlotte Collet<sup>a,b,c</sup>, Raphaël Hensienne<sup>a,b</sup>, Christine Vala<sup>a,b</sup>,  
Françoise Chrétien<sup>a,b</sup>, Yves Chapleur<sup>a,b,c</sup>, Amel Mohamadi<sup>a,d</sup>, Patrick Lacolley<sup>a,d</sup>, Véronique Regnault<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> Université de Lorraine, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France

<sup>b</sup> CNRS, UMR 7565, F-54506 Vandoeuvre les Nancy, France

<sup>c</sup> CHU de Nancy, Nancytotep, 3 Rue du Morvan, F-54500 Vandoeuvre les Nancy, France

<sup>d</sup> INSERM U1116, 9 av. de la forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 July 2014  
Revised 19 September 2014  
Accepted 25 September 2014  
Available online 27 October 2014

#### Keywords:

Glycoconjugate  
Click chemistry  
CuAAC  
Peptide  
RGD

### ABSTRACT

'Click' glycosylation of cysteine-containing peptides were carried out in good yield by Copper(I)-catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition (CuAAC). For that peptides were functionalized through direct propargylation of the cysteine residue allowing their use in CuAAC with suitable free or protected azido sugars of *gluco*, *mano* and *galacto* configuration. Among these free and protected glycopeptides a series of 'glycoRGD' peptides were obtained and submitted to in vitro platelet aggregation tests, showing that the pseudoglycosylation of the adhesion sequence lowers the IC<sub>50</sub> value and thus could improve the in vivo pharmacokinetic properties.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The glycosylation of proteins is an important process which controls the conformation and/or the biological properties of the biomolecule. This important process is rather difficult to mimic by chemical methods owing to the difficulty to selectively establish glycosidic linkages on a multifunctional peptide backbone.<sup>1</sup> Alternate strategies of linking biomolecules have been searched for and rapid and efficient methods have been reported.<sup>2,3</sup> The concept of click chemistry has been proposed as a powerful tool to link two partners using a rapid and often side-product free reaction.<sup>4</sup> Nevertheless, all these approaches need some selective and efficient modifications of the partners for example of the peptide. This concept has been widely and successfully used in carbohydrate chemistry.<sup>5</sup> The click version of the Huisgen cycloaddition has attracted considerable attention allowing the connection between sugar and amino-acids<sup>6</sup> or more complex constructions.<sup>7</sup>

In connection with our search for a fast sugar–peptide ligation process, usable with labeled sugars,<sup>8</sup> we reasoned that biologically significant peptides or proteins often contain a cysteine residue not embedded in a disulfide bond. With the aim of an application for PET imaging, the conjugation method has to be regioselective

and compatible with a fluorine-18 (<sup>18</sup>F) radiolabelling step using harsh conditions which will be done before the coupling. This precludes the use of the efficient, but reversible cysteine–maleimide bond formation as a coupling method.<sup>9</sup> The high nucleophilicity of the thiol function can be exploited to prepare S-alkylated derivatives.<sup>10</sup> For example, the introduction of a propargyl group on a cysteine residue would allow its use in click triazole formation with a suitable azido sugar which could be labeled with short-lived fluorine-18. This possibility of exploiting S-propargyl-cysteine derivatives for connection to a sugar has not been used until recently. An elegant solution has been proposed by Dondoni<sup>11</sup> to connect 1-thiosugars with cysteine-containing peptides using a click ene reaction. The use of strained alkynes as a partner in a copper free click cycloaddition was not primarily considered given the easiness of the S-propargylation of cysteine.<sup>12</sup> Following our paper on our preliminary results in the formation of neoglycoconjugates using S-propargyl cysteine derivatives<sup>13</sup> we report here more examples and some results showing the influence of the glycoconjugation on the biological properties of the conjugates.

### 2. Results and discussion

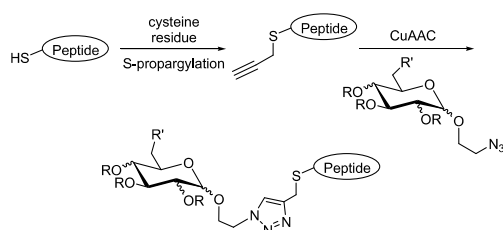
#### 2.1. Synthesis of neoglycopeptides

The synthetic strategy developed and shown on Scheme 1, requires a glucidic partner equipped with an azide group suitable

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 47 77; fax: +33 3 83 68 47 80.  
E-mail address: [Sandrine.langle@univ-lorraine.fr](mailto:Sandrine.langle@univ-lorraine.fr) (S. Lamandé-Langle).

S. Lamandé-Langle et al. / Bioorg. Med. Chem. 22 (2014) 6672–6683

6673



Scheme 1. Synthetic strategy for 'click' glycosylation of peptides.

for a Copper(I)-catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition (CuAAC). The introduction of the azide on the sugar and the propargyl on the peptide and not the opposite was decided for different reasons. Indeed, propargyl bromide is quickly introduced on the cysteine by a simple alkylation reaction in aqueous medium. Introduction of an azido group on cysteine would require the preparation of a less reactive and more sensitive azido bromo ethylene derivative. 2-Azido ethyl glycosides were chosen as carbohydrate components. The primary azide function was supposed to be reactive and the two carbon link between the sugar and the peptide in the final product was a good compromise in terms of flexibility and length. Moreover, 2-azido ethyl glycosides are easily prepared by known methods, mainly by boron trifluoride-etherate catalyzed glycosylation of the peracetylated sugars with bromoethanol or Fischer glycosylation with the same, and subsequent nucleophilic substitution in the presence of sodium azide in hot DMF. To evaluate the scope and limitations of the reaction, four pyranosides derivatives of *gluco*, *manno* and *galacto* configuration having different anomeric configurations were selected as sugar components.

Compounds **1**, **3** and **5** were prepared according to known methods to provide compounds  $\beta$ -*gluco* **1**,<sup>14</sup>  $\alpha$ -*manno* **3**<sup>15</sup> and  $\beta$ -*galacto* **5**<sup>7k</sup> in 65%, 65% and 60% yield, respectively. Compound **7** of  $\alpha$ -*gluco* configuration was synthesized by a Fischer glycosylation using 2-bromoethanol followed by peracetylation with acetic anhydride in pyridine. Substitution with azide was carried out in hot DMF as before to give **7**<sup>16</sup> in 10% yield over the three steps. The four compounds were quantitatively deprotected to the free sugars **2**,<sup>16</sup> **4**,<sup>17</sup> **6**<sup>7k</sup> and **8**<sup>16</sup> by Zemplen deacetylation (Fig. 1).

In the context of peptides labelling for PET application<sup>8</sup> 6-fluoro sugars were envisioned as prosthetic groups<sup>9</sup> thus the coupling of the later with peptides was investigated. These compounds were prepared from 2-azido ethyl glycosides **2**, **4** and **8** by a one-pot protection of the primary alcohol with trityl chloride followed by peracetylation. Intermediates **12**, **13** and **14**, were then obtained after removal of the trityl group carried out in a 3:1 AcOH–H<sub>2</sub>O solution.<sup>19</sup> Finally these compounds were fluorinated with DAST and deprotected to provide fluoro compounds **18**, **19** and **20** in good yields (Scheme 2).

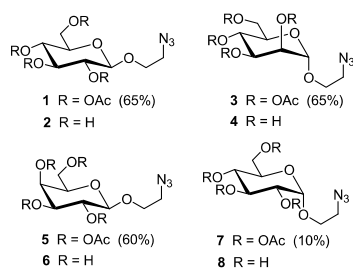
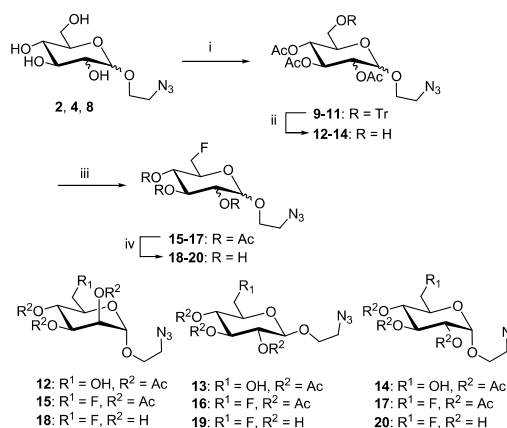
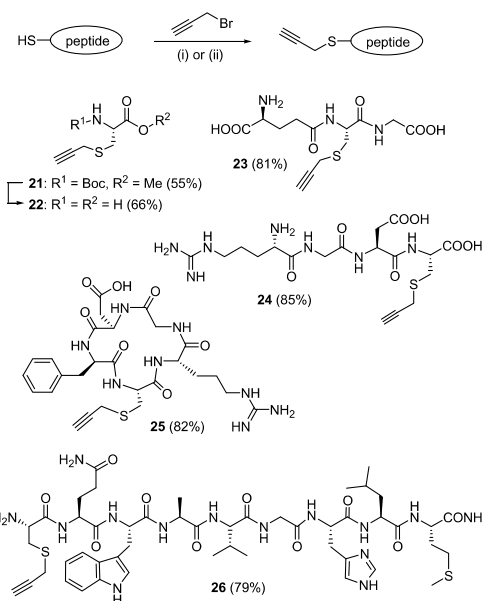


Figure 1. Deprotected and peracetylated azido-carbohydrates.



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) (1) TrCl, pyridine, DMAP (cat), rt. (2) Ac<sub>2</sub>O, rt, 1 h, 60–84%; (ii) AcOH/H<sub>2</sub>O 3:1, 80 °C, 1 h, 38–93%; (iii) DAST, diglyme, 110 °C, 1 h, 25–70%; (iv) Na<sup>+</sup>, MeOH, rt, 1 h30, 76–95%.



Scheme 3. Reagents and conditions: (i) DMF, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; (ii) H<sub>2</sub>O, MeOH, NH<sub>4</sub>OH, rt, 3 h.

With these azido sugars in hand, the S-alkylation of several cysteine-containing peptide models was investigated. The first experiment involved Boc-OMe-cysteine which was reacted with propargyl bromide in DMF in the presence of cesium carbonate<sup>7c</sup> giving the propargylated protected cysteine **21** in 55% yield (Scheme 3). Deprotection of **21** by basic hydrolysis followed by acidic treatment provided the known free aminoacid **22**<sup>7b</sup> in 66% yield. Although, efficient, this method used a solid base which complicated the work-up and explained the modest yield observed in the alkylation step. Moreover, it proved difficult to carry out on peptides with functional groups.

A more direct method for thiol propargylation was searched for using glutathione as a model of free tripeptide. When the later was treated at room temperature with one equivalent of freshly distilled propargyl bromide in a 1:1 methanol–water mixture and



6674

S. Lamandé-Langle et al. / Bioorg. Med. Chem. 22 (2014) 6672–6683

ammonia as base,<sup>8</sup> S-alkylation took place in 3 h giving derivative **23** in 85% yield. An almost pure compound was obtained bearing a single propargyl group as seen from proton NMR spectrum of the crude. The signal of the propargylic proton was observed at 2.60 ppm, chemical shifts of the methylene group of the propargyl at 3.29 ppm in <sup>1</sup>H NMR and at 18.9 ppm in <sup>13</sup>C NMR established the formation of a S-propargyl derivative. Mass spectra confirmed the formation of the expected product (Scheme 3).

The propargylation of the cysteine residue of biologically significant peptides was next explored. Integrin receptors recognize polypeptide domains containing the Arg-Gly-Asp (RGD) amino acid sequence,<sup>20</sup> which is present in several extracellular matrix proteins such as vitronectin. The glycosylation of these peptides has been reported and proved useful to target tumor cells and for imaging of tumor angiogenesis.<sup>21</sup> Two peptides containing the RGD adhesion sequence were chosen, the commercially available Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) and a cyclic form c(RGDfC).

A nine amino acid peptide Cys-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met (CQWAVGHLM) derived from bombesin was designed by adding a cysteine residue at the N-terminus. This peptide includes the active sequence of gastrin-releasing peptide (GRP) that exhibits high affinity and specificity to the GRP receptor (GRPr). These receptors are overexpressed in a variety of cancers, including small cell lung cancer (SCLC), prostate, breast, pancreas and gastrointestinal tumors.<sup>22</sup>

S-propargylation of commercially available RGDC, c(RGDfC) and CQWAVGHLM proceeded uneventfully using the above described methodology and gave the expected peptides **24**, **25** and **26**, respectively, in good purity and yield by simple evaporation (Scheme 3). <sup>1</sup>H NMR of these crude products showed almost one species in up to 90% purity. Only one signal corresponding to the propargylic proton was observed around 2.65 ppm  $\pm$  0.5 ppm depending on the peptide. Mass spectrometry showed complete disappearance of starting materials and the exact mass of the desired products **24**, **25** and **26**.

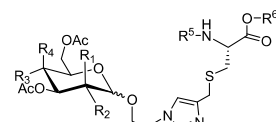
The CuAAC reaction was tested first with the three protected carbohydrates **1**, **3** and **5** and the three S-propargyl derivatives **21**, **22** and **23**. The reaction was performed using standard procedures in a 1:1 *tert*-butyl alcohol–water mixture in the presence of sodium ascorbate as the reducing agent and with copper(II) acetate as the catalyst. The results of these cycloadditions are summarized in Table 1. As seen from this Table, the reactions proceeded under very mild conditions giving high yields of the expected 1,4-triazoles as the only products (Fig. 2). Interestingly the reaction medium became immediately light green on addition of copper acetate to the alkyne and azide mixture and turned blue within 1–2 h at which time the reaction was completed as seen by tlc from sugar consumption.

The reaction between free and water soluble carbohydrates **2**, **4**, **6**, **8**, **18**, **19** and **20** and peptides **23**, **24**, **25** and **26** was performed as before at room temperature using 10% mol of Cu(OAc)<sub>2</sub> as the

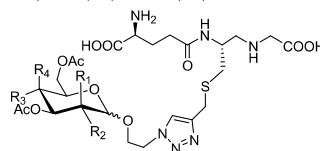
Table 1

Click coupling of peracetylated azido-carbohydrate and S-propargylated cysteine and glutathione

Entry	Azide component	Alkyne component	Product	Time (h)	Yield (%)
1	1	21	27	2	73
2	1	22	30	2	70
3	1	23	33	2	83
4	3	21	28	2	90
5	3	22	31	2	75
6	3	23	34	2	85
7	5	21	29	2	73
8	5	22	32	1	62
9	5	23	35	1	60



- 27** R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup> = H, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = OAc, R<sup>5</sup> = Boc, R<sup>6</sup> = Me  
**28** R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> = H, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> = OAc, R<sup>5</sup> = Boc, R<sup>6</sup> = Me  
**29** R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> = H, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> = OAc, R<sup>5</sup> = Boc, R<sup>6</sup> = Me  
**30** R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup> = H, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = OAc, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> = H  
**31** R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> = H, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> = OAc, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> = Me  
**32** R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> = H, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> = OAc, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> = H



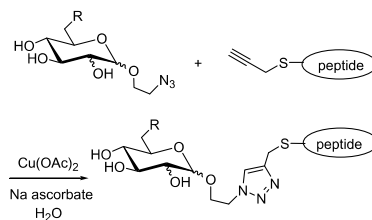
- 33** R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup> = H, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = OAc  
**34** R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> = H, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> = OAc  
**35** R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> = H, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> = OAc

Figure 2. Peracetylated glyco-cysteines and glyco-glutathiones.

catalyst in the presence of 20% mol of sodium ascorbate as reducing agent but in water (Table 2). The reaction was difficult to monitor by tlc, but it appeared that the color change of the medium was a good indicator of reaction completion. The work-up consisted on removal of copper ions with a chelating resin and freeze-drying. As for protected sugar the major isomer (1,4-triazole) was accompanied by variable amount (less than 10%) of another yet unidentified triazole, not the 1,5-triazole, as seen from NMR of the crude.<sup>13</sup> The expected 1,2,3-triazoles **36–51** were obtained in good yields (Fig. 3) after purification by LH20 gel filtration. High resolution mass spectrometry confirmed the structure of the adduct as well as NMR data.

Table 2

Click coupling of free azido-carbohydrates and S-propargylated peptides



Entry	Azide component	Alkyne component	Product	Time (h)	Yield (%)
1	2	23	36	1	66
2	2	24	43	2	71
3	4	23	37	1	62
4	4	24	44	2	63
5	6	23	38	1	55
6	6	24	45	1	52
7	8	23	39	2	67
8	18	23	40	2	80
9	18	24	46	2	68
10	19	23	41	2	55
11	19	24	47	1	67
12	19	25	49	2	59
13	19	26	50	2	58
14	20	23	42	2	69
15	20	24	48	2	57
16	20	26	51	2	60

S. Lamandé-Langle et al. / Bioorg. Med. Chem. 22 (2014) 6672–6683

6675

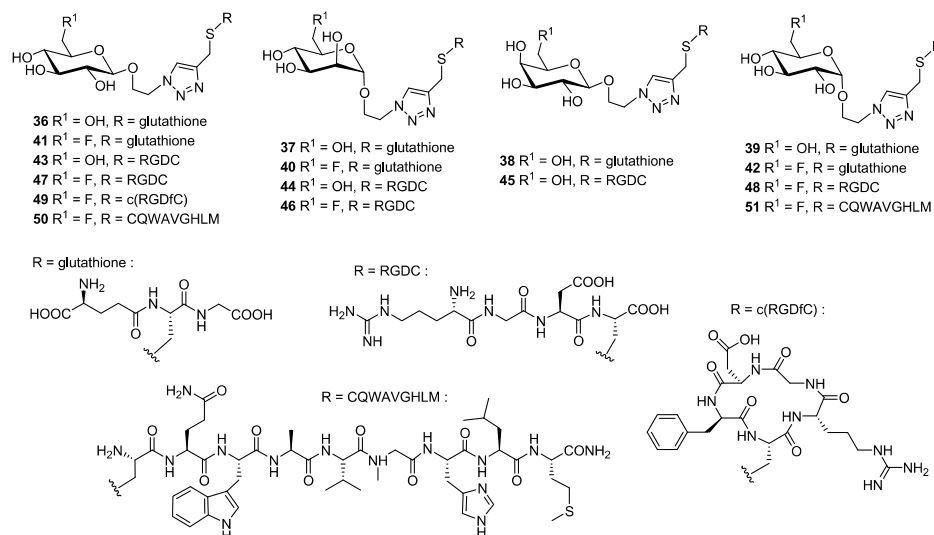


Figure 3. Free glycopeptides.

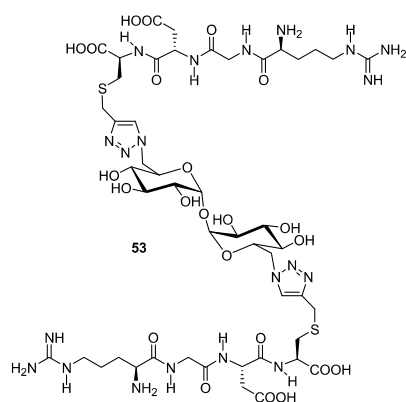


Figure 4. Bis glycopeptide.

From these results, it is clear that the structure of the starting 2-azido ethyl glycosides and its anomeric configuration had no influence on the course of the click Huisgen reaction. The presence of a fluorine atom at position 6 of the sugar also did not have an effect on the course of the cycloaddition. All the glycopeptides and fluoroglycopeptides were obtained in good yields. The efficiency of the process was confirmed by the CuACC reaction of a bis 6-azido sugar with two equivalents of propargylated peptide RGDC **24**. Thus, using the same methodology, the bis-6-azido trehalose **52**<sup>23</sup> was reacted with **24** to give the expected bis glycopeptide **53** (Fig. 4) in 65% yield.

## 2.2. Biological evaluation

To evaluate the influence of the sugar moiety on the biological activity of our conjugates, RGD-containing glycoconjugates, which are potential ligands of integrins,<sup>24</sup> seemed appropriate. Thus these compounds were evaluated and their activities compared to those of the native peptide. The ability of the eight RGD-containing glycopeptides to inhibit ADP-induced platelet aggregation, thanks

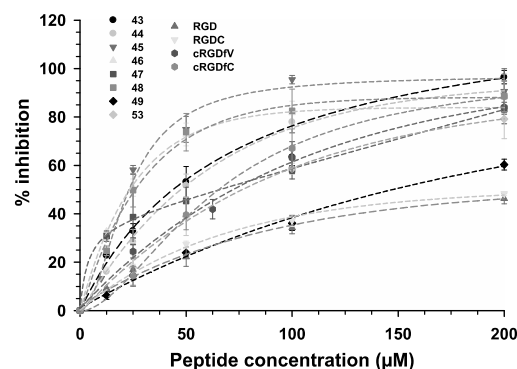


Figure 5. Effects of peptides on ADP-induced platelet aggregation. Platelet aggregation in human citrated PRP was triggered by 2.5  $\mu$ M ADP and monitored by turbidimetric aggregometry. PRP was stimulated by active peptides at concentrations varying from 12.5 to 200  $\mu$ M. Inhibition of platelet aggregation was measured at the maximal aggregation response. The results are the mean  $\pm$  SEM of 7 independent experiments with PRP from different donors.

to their specificity to  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrins,<sup>25</sup> was measured and compared to reference peptides, that is, linear ones (the minimal recognition sequence RGD and RGDC as structural reference) and cyclic peptides (c(RGDfV) and c(RGDfC)). All compounds inhibited the aggregation of platelets in citrated platelet-rich plasma (PRP) induced by 2.5  $\mu$ M ADP. As shown in Figure 5, the concentration–response curves of c(RGDfV) and c(RGDfC) peptides and all glycopeptides except **49** were shifted upwards compared to those of RGD or RGDC peptides. IC<sub>50</sub> values for the maximum aggregation response are listed in Table 3.

## 2.3. Discussion

From these results it appears that S-propargyl-cysteine derivatives including highly functional peptides are easily available in a highly regiospecific manner by treatment of free peptides with propargyl bromide in basic medium. This simple derivatization

6676

S. Lamandé-Langle et al. / Bioorg. Med. Chem. 22 (2014) 6672–6683

**Table 3**  
IC<sub>50</sub> of glycopeptides and reference peptides in ADP-induced platelet aggregation

Entry	Peptide/glycopeptide	Structure	IC <sub>50</sub> (μM)
1	Linear reference	RGD	319
2	Linear reference	RGDC	322
3	Cyclic reference	c(RGDFV)	72
4	Cyclic reference	c(RGDfC)	65
5	<b>45</b>	OH-β-gal-RGDC	23
6	<b>44</b>	OH-α-man-RGDC	47.6
7	<b>43</b>	OH-β-galuc-RGDC	44
8	<b>46</b>	F-α-man-RGDC	23.5
9	<b>47</b>	F-β-galuc-RGDC	66
10	<b>48</b>	F-α-galuc-RGDC	26
11	<b>49</b>	F-β-galuc-c(RGDfC)	147.5
12	<b>53</b>	Trehalose-(RGDC) <sub>2</sub>	76.5

can be performed in the presence of carboxylic, amino and guanidino groups. 2-Azido ethyl glycosides reacted efficiently with these alkynylated peptides in a click Huisgen reaction, whatever the sugar and the anomeric configuration (β-*gluco*, α-*manno*, β-*galacto* and α-*gluco*). The reaction proceeds well in water in short reaction times and high yields and tolerates the presence of a fluorine atom on the sugar. The biological effect of peptides on αIIbβ3-mediated platelet aggregation has been examined. As expected, the IC<sub>50</sub> values of linear references RGD or RGDC were higher than that of cyclic references c(RGDFV) and c(RGDfC), in agreement with the idea that cyclic RGD peptides are more effective inhibitors of platelet aggregation than linear RGD peptides. It is noteworthy that the RGDC sequence had the same inhibitory activity than RGD (compare entries 1 and 2). The same holds for cyclic peptides (compare entries 3 and 4). This confirmed that introduction of a cysteine residue had not significant effect on activity. Interestingly all glycopeptides were more potent inhibitors than the RGD sequence. They can be divided in three groups according to their IC<sub>50</sub> values. The first group encompasses peptides **47** and **53** (entries 9 and 12) with the lowest inhibitory activity, the second group of peptides **44** and **43** (entries 6 and 7) with an intermediate inhibitory activity and the third group comprises peptides **45**, **46** and **48** (entries 5, 8 and 10) with the highest inhibitory activity. The cyclo-fluorinated glycopeptide **49** displayed the lowest inhibitory activity (entry 11). Linear fluorinated glycopeptides **46** and **48**, with IC<sub>50</sub> values in the low micromolar range were the most potent inhibitors for this series of ADP-induced platelet aggregation and have thus been identified as potential candidates to develop a radiotracer for in vivo imaging of β<sub>3</sub> integrins. Moreover, all linear glycopeptides have a higher inhibitory activity than cyclic peptides in this assay. These findings suggest that addition of sugar moieties on linear forms strongly modifies either the physicochemical properties or induces beneficial conformational modifications of the peptide as in the cyclic form. Interestingly, introduction of a fluorine atom on glycopeptides (entries 8 and 9) did not change significantly IC<sub>50</sub> values compared to the non-fluorinated glycopeptides (entries 6 and 7).

### 3. Conclusion

In conclusion, the propargylation of cysteine residues of simple amino-acids or complex peptides is an easily performed reaction to get S-propargyl thioethers which can be regarded as a click chemistry reaction. The S-propargyl function reacts well with azido ethyl glycosides and provides an easy and fast ligation method of sugars with cysteine containing peptides. We found almost no limitation in the structure of the sugar and in sensitive functions present on complex peptides such as guanidine, carboxylate or primary amide. In vitro studies of ADP-induced platelet aggregation inhibition show that introduction of a carbohydrate moiety on linear RGD peptides strongly enhances inhibitory activity. This simple structural modification is as efficient as inclusion of the RGD

sequence in cyclic peptides. The process is applicable to fluoro sugars paving the way to <sup>18</sup>F labeled constructions suitable for PET application. We are currently exploring this approach.

## 4. Experimental

### 4.1. General

Solvents and liquid reagents were purified and dried according to recommended procedures. TLC analyses were performed using standard procedures on Kieselgel 60 F<sub>254</sub> plates or RP-18 F<sub>254</sub> plates (Merck). Compounds were visualized using UV light (254 nm) and a methanolic solution of sulfuric acid and charred. Column chromatography was performed on silica gel SI 60 (63–200 μm) (Merck). Purification of free compounds was achieved by gel filtration on LH20 using water or water/methanol mixture as eluent. Melting points were determined with a Tottoli apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured on an Anton-Paar MCP 300 polarimeter. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR and <sup>19</sup>F spectra were recorded on a Bruker spectrometer DPX250 (250 MHz, 62.9 MHz and 235 MHz, respectively) or DRX400 (400 MHz and 100.6 MHz, respectively). For complete assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C signals, two-dimensional <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H COSY and <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C correlation spectra were recorded. Chemical shifts (δ) are given in ppm relative to the solvent residual peak. The following abbreviations are used for multiplicity of NMR signals: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, b = broad signal and app = apparent multiplicity. The given J values refer to apparent multiplicities and do not represent the true coupling constants. The protons and carbons of the ethyl arm are numbered 7 and 8 in the NMR description. Mass and HRMS spectra were recorded on a Bruker microTOFQ apparatus and MALDI spectra on a Bruker Ultraflex apparatus.

The following known compounds are not described:

S-Propargyl-N-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-L-cysteine methyl ester (**21**).<sup>10c</sup>

S-Propargyl-L-cysteine hydrochloride (**22**).<sup>10b</sup>

Bis-6-azido trehalose (**52**).<sup>23</sup>

### 4.2. Preparation of 2-azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-trityl-α-D-mannopyranoside (9), 2-azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-trityl-β-D-glucopyranoside (10) and 2-azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-trityl-α-D-glucopyranoside (11)

To a solution of compound **2**,<sup>16</sup> **4**<sup>17</sup> or **8**<sup>16</sup> (35 mmol, 8.6 g) in pyridine (200 mL) was added at room temperature TrCl (63 mmol, 17.6 g) and a catalytic amount of DMAP (3.5 mmol, 430 mg). The solution was stirred at room temperature until completion (TLC monitoring) then Ac<sub>2</sub>O (45 mL) was added and the reaction was stirred for 3 h. Water was then added (150 mL) and extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The organic layer was washed with HCl 1 M (150 mL), water, saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (150 mL) and brine (100 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, Hex/EtOAc 60:40) to obtain **9**, **10** or **11**.

#### 4.2.1. 2-Azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-trityl-α-D-mannopyranoside (9)

Yield: 62%; R<sub>f</sub> 0.4 (Hex/EtOAc 60:40); white solid; mp = 58 °C; [α]<sub>D</sub> +49.3 (1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR: film (ν, cm<sup>-1</sup>): 3059, 2932, 2105, 1748, 1371; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 1.76 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.19 (dd, 1H, J<sub>6,6'</sub> = 10.5 Hz, J<sub>5,6</sub> = 5.5 Hz, H<sub>6</sub>), 3.23 (dd, 1H, J<sub>5,6'</sub> = 2.5 Hz, H<sub>6'</sub>), 3.41–3.55 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 3.72 (ddd, 1H, J<sub>7,7'</sub> = 10.5 Hz, J<sub>7,8</sub> = 6.5 Hz, J<sub>7,8'</sub> = 4.0 Hz, H<sub>7</sub>), 3.95–4.00 (m, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>7'</sub>), 4.94 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 1.5 Hz, H<sub>1</sub>),

5.27–5.37 (m, 3H, H2, H3, H4), 7.21–7.35 (m, 9H, H-Ar), 7.46 (dd, 6H,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, H-Ar);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz)  $\delta$  21.0 ( $\text{CH}_3$ ), 21.1 ( $\text{CH}_3$ ), 21.3 ( $\text{CH}_3$ ), 50.8 (C-8), 62.8 (C-6), 66.8 (C-4), 67.1 (C-7), 69.6 (C-3 or C-2), 70.1 (C-3 or C-2), 71.0 (C-5), 87.0 (Cq Tr), 97.9 (C-1), 127.4 (3C-Ar), 128.2 (6C-Ar), 129.1 (6C-Ar), 144.1 (Cq-Ar), 169.8 (C=O), 170.4 (C=O), 170.5 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_9\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  640.2271, found: 640.2336.

#### 4.2.2. 2-Azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-trityl- $\beta$ -D-glucopyranoside (10)

Yield: 60%;  $R_f$  0.45 (Hex/EtOAc 60:40); white solid; mp = 68 °C;  $[\alpha]_D +9.8$  (1.0,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2881, 2104, 1757, 1219;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.75 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.00 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.07 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.12 (dd, 1H,  $J_{6,6'} = 10.5$  Hz,  $J_{6,5} = 5.0$  Hz, H6), 3.28 (dd, 1H,  $J_{6,5} = 2.5$  Hz, H6'), 3.30–3.35 (m, 1H, H8), 3.50–3.62 (m, 2H, H5, H8'), 3.78 (ddd, 1H,  $J_{7,7'} = 11.0$  Hz,  $J_{7,8} = 8.0$  Hz,  $J_{7,8'} = 3.0$  Hz, H7), 4.05–4.15 (m, 1H, H7'), 4.61 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.5$  Hz, H1), 5.05–5.22 (m, 3H, H2, H3, H4), 7.20–7.34 (m, 10H, H-Ar), 7.42–7.48 (m, 5H, H-Ar);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz)  $\delta$  20.4 ( $\text{CH}_3$ ), 20.6 ( $\text{CH}_3$ ), 20.7 ( $\text{CH}_3$ ), 50.6 (C-8), 61.9 (C-6), 68.2 (C-7), 68.7 (C-4), 71.3 (C-2), 73.1 (C-5), 73.5 (C-3), 86.6 (Cq Tr), 100.8 (C-1), 127.1 (3C-Ar), 127.8 (6C-Ar), 128.7 (6C-Ar), 143.5 (3Cq-Ar), 168.9 (C=O), 169.5 (C=O), 170.4 (C=O); MS  $m/z$  (ESI) 640  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; Anal. Calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_9$ : C: 64.17; H: 5.71; N: 6.80. Found: C: 64.29; H: 5.80; N: 6.61.

#### 4.2.3. 2-Azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-trityl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (11)

Yield: 84%;  $R_f$  0.45 (CycloHex/EtOAc 60:40); white solid; mp = 117 °C;  $[\alpha]_D +108.8$  (0.5,  $\text{CHCl}_3$ ); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2934, 2107, 1754, 1224, 1043;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.76 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.14 (dd, 1H,  $J_{6,6'} = 10.5$  Hz,  $J_{6,5} = 5.0$  Hz, H6), 3.23 (dd, 1H,  $J_{6,5} = 2.0$  Hz, H6'), 3.43 (ddd, 1H,  $J_{8,8'} = 13.5$  Hz,  $J_{8,7} = 6.0$  Hz,  $J_{8,7'} = 3.5$  Hz, H8), 3.53 (ddd, 1H,  $J_{8,7} = 7.0$  Hz,  $J_{8,7'} = 3.5$  Hz, H8'), 3.70 (ddd, 1H,  $J_{7,7'} = 10.5$  Hz, H7), 3.95–4.02 (m, 2H, H5 and H7'), 4.95 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.0$  Hz,  $J_{2,1} = 4.0$  Hz, H2), 5.12 (app t, 1H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 10.0$  Hz, H4), 5.22 (d, 1H, H1), 5.48 (app t, 1H, H3), 7.25 (bt, 3H,  $J = 7.0$  Hz, H-Ar), 7.31 (bt, 6H,  $J = 7.0$  Hz, H-Ar), 7.45 (bd, 6H, H-Ar);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz)  $\delta$  20.5 ( $\text{CH}_3$ ), 20.7 ( $\text{CH}_3$ ), 20.7 ( $\text{CH}_3$ ), 50.4 (C-8), 62.0 (C-6), 67.0 (C-7), 69.0 (C-4), 69.1 (C-5), 70.4 (C-3), 70.9 (C-2), 86.6 (Cq-Tr), 95.8 (C-1), 127.0 (3C-Ar), 127.8 (6C-Ar), 128.7 (6C-Ar), 143.6 (3Cq-Ar), 169.3 (C=O), 170.2 (C=O), 170.4 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_9\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  640.2271, found: 640.2277.

#### 4.3. Preparation of 2-azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (12), 2-azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (13) and 2-azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (14)

To a solution of AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$  3:1 (230 mL) was added sugar **9**, **10** or **11** (25 mmol, 15.4 g) and the reaction was stirred at 80 °C for 1 h 30 min. After completion of the reaction, the solvent was evaporated and co-evaporated three times with toluene. The crude product was purified by chromatography (silica gel, Hex/EtOAc 50:50 to 30:70) to obtain **12**, **13** or **14**.

#### 4.3.1. 2-Azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (12)

Yield: 75%;  $R_f$  0.15 (Hex/EtOAc 50:50); oil;  $[\alpha]_D +44.8$  (1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3469, 2107, 1752, 1639, 1371;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.99 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.08 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.14 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.35–3.55 (m, 2H, H8), 3.60–3.70 (m, 3H, 2H6, H7), 3.80–3.95 (m, 2H, H5, H7'), 4.89 (d, 1H,  $J_{1,2} = 1.5$  Hz, H1), 5.25 (app t, 1H,  $J_{4,5} = J_{4,3} = 10.0$  Hz, H4), 5.28 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 3.5$  Hz, H2),

5.40 (dd, 1H, H3);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz)  $\delta$  21.1 ( $\text{CH}_3$ ), 21.1 ( $\text{CH}_3$ ), 21.2 ( $\text{CH}_3$ ), 50.7 (C-8), 61.6 (C-6), 66.7 (C-4), 67.3 (C-7), 69.0 (C-3), 69.8 (C-2), 71.4 (C-5), 98.1 (C-1), 170.2 (C=O), 170.4 (C=O), 171.3 (C=O); MS  $m/z$  (ESI) 398  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; Anal. Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_9$ : C: 44.80; H: 5.63; N: 11.19, found: C: 44.02; H: 5.64; N: 10.71.

#### 4.3.2. 2-Azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (13)

Yield: 93%;  $R_f$  0.2 (Hex/EtOAc 60:40); white solid; mp = 112 °C;  $[\alpha]_D -42.0$  (1.0,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3457, 2924, 2105, 1755, 1218;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)  $\delta$  2.01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.05 (s, 6H, 2 $\text{CH}_3$ ), 3.29 (ddd, 1H,  $J_{8,8'} = 13.5$  Hz,  $J_{8,7} = 5.0$  Hz,  $J_{8,7'} = 3.5$  Hz, H8), 3.40–3.78 (m, 5H, H5, 2H6, H7, H8'), 4.04 (ddd, 1H,  $J_{7,7'} = 10.5$  Hz,  $J_{7,8} = 3.5$  Hz, H7'), 4.63 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz, H1), 4.97–5.09 (m, 2H, H4, H2), 5.27 (app t, 1H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$  Hz, H3);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz)  $\delta$  20.5 ( $\text{CH}_3$ ), 20.6 ( $\text{CH}_3$ ), 20.6 ( $\text{CH}_3$ ), 50.5 (C-8), 61.2 (C-6), 68.4 (C-7), 68.6 (C-4), 71.2 (C-2), 72.7 (C-5), 74.2 (C-3), 100.6 (C-1), 169.4 (C=O), 170.1 (C=O), 170.2 (C=O); MS  $m/z$  (ESI) 398  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; Anal. Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_9$ : C: 44.80; H: 5.63; N: 11.19, found: C: 45.19; H: 5.75; N: 10.88.

#### 4.3.3. 2-Azidoethyl 2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (14)

Yield: 38%;  $R_f$  0.44 (CycloHex/EtOAc 40:60); white solid; mp = 78 °C;  $[\alpha]_D +134.3$  (0.5,  $\text{CHCl}_3$ ); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3483, 2928, 2109, 1751, 1370, 1226, 1039;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  2.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.07 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.39 (ddd, 1H,  $J_{8,8'} = 13.5$  Hz,  $J_{8,7} = 6.0$  Hz,  $J_{8,7'} = 3.5$  Hz, H8), 3.48 (ddd, 1H,  $J_{8,7} = 7.0$  Hz,  $J_{8,7'} = 3.5$  Hz, H8'), 3.56–3.61 (m, 1H, H6), 3.62 (ddd, 1H,  $J_{7,7'} = 10.5$  Hz, H7), 3.71 (bdd, 1H,  $J_{6,6'} = 12.5$  Hz,  $J_{6,5} = 7.5$  Hz, H6'), 3.81–3.86 (m, 1H, H5), 3.87 (ddd, 1H, H7'), 4.85 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.0$  Hz,  $J_{2,1} = 3.5$  Hz, H2), 5.02 (app t, 1H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 10.0$  Hz, H4), 5.14 (d, 1H, H1), 5.56 (app t, 1H, H3);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz)  $\delta$  20.6 (2 $\text{CH}_3$ ), 20.7 ( $\text{CH}_3$ ), 50.4 (C-8), 61.0 (C-6), 67.3 (C-7), 68.8 (C-4), 69.6 (C-3), 69.7 (C-5), 70.8 (C-2), 96.0 (C-1), 170.0 (C=O), 170.4 (C=O), 170.6 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_9\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  398.1170, found: 398.1172.

#### 4.4. Preparation of 2-azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (15), 2-azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro-2,3,4-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (16) and 2-azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (17)

To a solution of sugar **12**, **13** or **14** (0.8 mmol, 300 mg) in diglyme (6 mL) was added DAST (0.21 mL, 1.6 mmol). The reaction was heated at 110 °C during 45 min then cooled to 0 °C and methanol (1 mL) was carefully added. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution (10 mL). The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, Hex/EtOAc 70:30) to afford **15**, **16** or **17**.

#### 4.4.1. 2-Azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (15)

Yield: 70%;  $R_f$  0.38 (Hex/EtOAc 60:40); oil;  $[\alpha]_D +42.9$  (1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2942, 2107, 1753, 1372, 1247, 1221;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)  $\delta$  2.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.09 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.45 (ddd, 1H,  $J_{8,8'} = 13.0$  Hz,  $J_{8,7} = 6.0$  Hz,  $J_{8,7'} = 4.0$  Hz, H8), 3.52 (ddd, 1H,  $J_{8,7} = 7.0$  Hz,  $J_{8,7'} = 4.0$  Hz, H8'), 3.65–3.73 (m, 1H, H7), 3.91 (ddd, 1H,  $J_{7,7'} = 10.5$  Hz, H7'), 4.00–4.12 (m, 1H, H5), 4.42–4.51 (bdd, 2H,  $J_{H,F} = 47.0$  Hz,  $J_{6,5} = 4.5$  Hz, 2H6), 4.90 (d, 1H,  $J_{1,2} = 1.5$  Hz, H1), 5.30 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 3.5$  Hz, H2), 5.31 (app t, 1H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$  Hz, H4), 5.38 (dd, 1H, H3);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz)  $\delta$  21.1 ( $\text{CH}_3$ ), 21.1 ( $\text{CH}_3$ ), 21.3 ( $\text{CH}_3$ ), 50.7 (C-8), 65.9 (d,  $J_{C,F} = 6.5$  Hz, C-4), 67.5 (C-7), 69.2 (C-3), 69.7

(C-2), 70.0 (d,  $J_{C,F}$  = 19.0 Hz, C-5), 81.9 (d,  $J_{C,F}$  = 176.0 Hz, C-6), 98.1 (C-1), 170.2 (C=O), 170.2 (C=O), 170.5 (C=O);  $^{19}\text{F}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 235 MHz)  $\delta$  -231.6; HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_8\text{FNa}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  400.1132, found: 400.1131.

**4.4.2. 2-Azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro-2,3,4-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (16)**

Yield: 70%;  $R_f$  0.4 (Hex/EtOAc 60:40); white solid; mp = 105 °C;  $[\alpha]_D$  -29.3 (1.0,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3488, 2944, 2106, 1756, 1219, 1038;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.99 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.28 (ddd, 1H,  $J_{8,8'} = 13.5$  Hz,  $J_{8,7} = 5.0$  Hz,  $J_{8,7'} = 3.5$  Hz, H8), 3.43–3.82 (m, 5H, H5, 2H6, H7, H8'), 4.05 (ddd, 1H,  $J_{7,7'} = 10.5$  Hz,  $J_{7,8'} = 3.5$  Hz, H7'), 4.62 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz, H1), 5.00 (dd, 1H,  $J_{4,3} = 9.5$  Hz,  $J_{4,5} = 5.0$  Hz, H4), 5.02 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 9.5$  Hz, H2), 5.24 (app t, 1H, H3);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz)  $\delta$  20.5 (2 $\text{CH}_3$ ) 20.6 ( $\text{CH}_3$ ), 50.5 (C-8), 68.0 (d,  $J_{C,F}$  = 6.9 Hz, C-4), 68.5 (C-7), 71.0 (C-2), 72.6 (C-3), 72.7 (d,  $J_{C,F}$  = 19.5 Hz, C-5), 81.3 (d,  $J_{C,F}$  = 175.0 Hz, C-6), 100.5 (C-1), 169.3 (C=O), 169.4 (C=O), 170.2 (C=O);  $^{19}\text{F}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 235 MHz)  $\delta$  -231.3 (td,  $J_{F,6} = J_{F,6'} = 47.0$  Hz,  $J_{F,5} = 19.0$  Hz); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_8\text{FNa}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  400.1132, found: 400.1128.

**4.4.3. 2-Azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (17)**

Yield: 65%;  $R_f$  0.34 (CycloHex/EtOAc 60:40); white solid; mp = 83 °C;  $[\alpha]_D$  +128.0 (0.2,  $\text{CHCl}_3$ ); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2947, 2109, 1753, 1369, 1223, 1037;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  2.00 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.44 (ddd, 1H,  $J_{8,8'} = 13.5$  Hz,  $J_{8,7} = 6.5$  Hz,  $J_{8,7'} = 3.5$  Hz, H8), 3.48 (ddd, 1H,  $J_{8,8'} = 13.5$  Hz,  $J_{8,7} = 6.5$  Hz,  $J_{8,7'} = 3.5$  Hz, H8'), 3.63 (ddd, 1H,  $J_{7,7'} = 10.5$  Hz, H7), 3.87 (ddd, 1H, H7'), 4.04 (ddt, 1H,  $J_{H,F} = 23.0$  Hz,  $J_{5,4} = 10.0$  Hz,  $J_{5,6} = 3.5$  Hz, H5), 4.47 (dd, 2H,  $J_{H,F} = 47.0$  Hz,  $J_{6,5} = 3.5$  Hz, H6 and H6'), 4.86 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.0$  Hz,  $J_{2,1} = 3.5$  Hz, H2), 5.04 (app t, 1H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 10.0$  Hz, H4), 5.13 (d, 1H, H1), 5.51 (app t, 1H, H3);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz)  $\delta$  20.6 ( $\text{CH}_3$ ), 20.6 ( $\text{CH}_3$ ), 20.7 ( $\text{CH}_3$ ), 50.3 (C-8), 67.4 (C-7), 68.1 (d,  $J_{C,F} = 7.0$  Hz, C-4), 68.4 (d,  $J_{C,F} = 19.5$  Hz, C-5), 69.9 (C-3), 70.5 (C-2), 81.3 (d,  $J_{C,F} = 174.5$  Hz, C-6), 95.9 (C-1);  $^{19}\text{F}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 235 MHz) -232.2 (td,  $J_{F,6} = J_{F,6'} = 47.0$  Hz,  $J_{F,5} = 23.0$  Hz); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_8\text{FNa}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  400.1132, found: 400.1143.

**4.5. Preparation of 2-azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro- $\alpha$ -D-mannopyranoside (18), 2-azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro- $\beta$ -D-glucopyranoside (19) and 2-azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranoside (20)**

To a solution of sugar **15**, **16** or **17** (1.11 mmol, 420 mg) in 8 mL of anhydrous methanol, was added a catalytic amount of sodium. The reaction was stirred during 2 h then neutralized by a resin (Amberlite® IR-120). The reaction mixture was filtered of and the solvent was removed under reduced pressure to give **18**, **19** or **20**.

**4.5.1. 2-Azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro- $\alpha$ -D-mannopyranoside (18)**

Yield: 83%; oil;  $[\alpha]_D$  +46.6 (1.0, MeOH); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3392, 2931, 2107, 1443, 1285;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  3.49 (ddd, 1H,  $J_{8,8'} = 13.5$  Hz,  $J_{8,7} = 6.5$  Hz,  $J_{8,7'} = 3.5$  Hz, H8), 3.55 (ddd, 1H,  $J_{8,8'} = 13.5$  Hz,  $J_{8,7} = 6.5$  Hz,  $J_{8,7'} = 3.5$  Hz, H8'), 3.72 (ddd, 1H,  $J_{7,7'} = 11.0$  Hz, H7'), 3.77–3.83 (m, 1H, H4), 3.79–3.88 (m, 1H, H5), 3.84–3.89 (m, 1H, H3), 3.91 (ddd, 1H, H7), 4.00 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 3.0$  Hz,  $J_{1,2} = 1.5$  Hz, H2), 4.61–4.84 (m, 2H, 2H6), 4.93 (d, 1H, H1);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  50.5 (C-8), 65.7 (d,  $J_{C,F} = 7.0$  Hz, C-4), 68.9 (C-7), 70.2 (C-2), 70.6 (C-3), 71.9 (d,  $J_{C,F} = 17.5$  Hz, C-5), 82.6 (d,  $J_{C,F} = 168.0$  Hz, C-6), 100.5 (C-1);  $^{19}\text{F}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 235 MHz)  $\delta$  -234.4; HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_5\text{FNa}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  274.0815, found: 274.0804.

**4.5.2. 2-Azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro- $\beta$ -D-glucopyranoside (19)**

Yield: 76%; oil;  $[\alpha]_D$  -92.1 (0.76,  $\text{H}_2\text{O}$ ); IR: KBr ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3393, 2924, 2108, 1346, 1288;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  3.15–3.25 (m, 1H, H2), 3.38–3.58 (m, 5H, 2H8, H5, H4, H3), 3.71–3.78 (m, 1H, H7), 3.90–3.97 (m, 1H, H7'), 4.44 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.5$  Hz, H1), 4.62 (dd, 2H,  $J_{H,F} = 47.5$  Hz,  $J_{6,5} = 2.0$  Hz, 2H6);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  50.9 (C-8), 68.6 (d,  $J_{C,F} = 7.0$  Hz, C-4), 69.0 (C-7), 73.3 (C-2), 74.8 (d,  $J_{C,F} = 17.5$  Hz, C-5), 75.8 (C-3), 82.2 (d,  $J_{C,F} = 169.0$  Hz, C-6), 102.8 (C-1);  $^{19}\text{F}$  NMR ( $\text{D}_4$ -MeOH, 235 MHz)  $\delta$  -235.6 (td,  $J_{F,6} = J_{F,6'} = 47.5$  Hz,  $J_{F,5} = 24.0$  Hz); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_5\text{FNa}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  274.0815, found: 274.0827.

**4.5.3. 2-Azidoethyl 6-deoxy-6-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranoside (20)**

Yield: 95%; white solid; mp = 70 °C;  $[\alpha]_D$  +91.8 (0.2,  $\text{H}_2\text{O}$ ); IR: KBr ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3426, 2933, 2113, 1281, 1026;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  3.48 (ddd, 1H,  $J_{8,8'} = 13.5$  Hz,  $J_{8,7} = 6.0$  Hz,  $J_{8,7'} = 3.0$  Hz, H8), 3.53 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 10.0$  Hz,  $J_{4,3} = 9.5$  Hz, H4), 3.59 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 9.5$  Hz,  $J_{2,1} = 4.0$  Hz, H2), 3.58–3.65 (m, 1H, H8'), 3.73 (ddd, 1H,  $J_{7,7'} = 11.0$  Hz,  $J_{7,8'} = 3.0$  Hz, H7), 3.77 (app t, 1H, H3), 3.89 (dddd, 1H,  $J_{H,F} = 29.0$  Hz,  $J_{5,6'} = 3.5$  Hz,  $J_{5,6} = 2.0$  Hz, H5), 3.92 (ddd, 1H,  $J_{7,8'} = 7.5$  Hz, H7'), 4.70 (ddd, 1H,  $J_{H,F} = 48.0$  Hz,  $J_{6,6'} = 11.0$  Hz, H6), 4.76 (ddd, 1H,  $J_{H,F} = 47.0$  Hz, H6'), 5.00 (d, 1H, H1);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  50.3 (C-8), 66.8 (C-7), 68.3 (d,  $J_{C,F} = 7.0$  Hz, C-4), 70.7 (d,  $J_{C,F} = 17.5$  Hz, C-5), 71.1 (C-2), 72.7 (C-3), 82.1 (d,  $J_{C,F} = 168.0$  Hz, C-6), 98.4 (C-1);  $^{19}\text{F}$  NMR ( $\text{D}_4$ -MeOH, 235 MHz)  $\delta$  -235.2 (td,  $J_{F,6} = J_{F,6'} = 48.0$  Hz,  $J_{F,5} = 29.0$  Hz); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_5\text{FNa}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  274.0815, found: 274.0805.

**4.6. General method for the propargylation of peptide**

To a solution of commercial peptide (0.075 mmol) in water (0.25 mL) and MeOH (0.25 mL), was added a 25% solution of  $\text{NH}_4\text{OH}$  (0.45 mL) at 0 °C. For the propargylation of CQWAVGHLM, the peptide was diluted in 1.25 mL of water and 1.25 mL of MeOH. A freshly distilled solution of propargyl bromide (9.9 mg, 0.082 mmol) in MeOH (0.25 mL) was then introduced. The reaction was stirred during 3 h at room temperature. The solution was concentrated under vacuum, water was then added and the solution was freeze-dried to provide **23**, **24**, **25** or **26**.

**4.6.1. (L-Arginyl glycyL-L-aspartyl-2-S-propyn-1-yl)-L-cysteine (23)**

Yield: 81%; white solid;  $[\alpha]_D$  -22.9 (1.5,  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  2.07 (dd, 2H,  $J = 15.0$  Hz,  $J = 7.5$  Hz, H $\beta$  Glu), 2.45 (m, 2H, H- $\gamma$  Glu), 2.60 (app t, 1H,  $J = 2.5$  Hz, H-alkyne), 2.92 (dd, 1H,  $J = 14.5$  Hz,  $J = 9.0$  Hz, H- $\beta$  Cys), 3.18 (dd, 1H,  $J = 5.0$  Hz, H- $\beta'$  Cys), 3.29 (m, 2H, H- $\gamma$  Cys), 3.70 (m, 3H, H- $\alpha$  Glu, H- $\alpha$  Gly), 4.65 (dd, 1H, H- $\alpha$  Cys);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  18.9 (C- $\gamma$  Cys), 26.2 (C- $\beta$  Glu), 31.4 (C- $\gamma$  Glu), 32.7 (C- $\beta$  Cys), 43.4 (C- $\alpha$  Gly), 52.8 (C- $\alpha$  Cys), 54.1 (C- $\alpha$  Glu), 72.5 (CH-alkyne), 80.3 (C-alkyne), 171.8 (C=O), 173.9 (C=O), 174.9 (C=O), 176.2 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$  [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$  344.0922, found: 344.0925.

**4.6.2. Arg-Gly-Asp-Cys(S-propargyl) (24)**

Yield: 85%; white solid;  $[\alpha]_D$  +1.0 (2.0,  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 250 MHz)  $\delta$  1.68 (m, 2H), 1.92 (m, 2H), 2.55 (dd, 1H,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 16.0$  Hz), 2.62–2.64 (m, 1H, H-alkyne), 2.70 (dd, 1H,  $J = 5.0$  Hz,  $J = 16.0$  Hz), 2.99 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 7.0$  Hz, H $\beta$ ), 3.10–3.35 (m, 5H), 3.75–4.25 (m, 3H), 4.38–4.48 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  18.9 ( $\text{CH}_2$ ), 23.4 ( $\text{CH}_2$ ), 28.0 ( $\text{CH}_2$ ), 33.1 ( $\text{CH}_2$ ), 38.3 ( $\text{CH}_2$ ), 40.4 ( $\text{CH}_2$ ), 42.3 ( $\text{CH}_2$ ), 51.6 ( $\text{CH}$ ), 52.8 ( $\text{CH}$ ), 54.4 ( $\text{CH}$ ), 72.4 (CH-alkyne), 80.4 (C-alkyne), 156.8 (C=N), 170.2 (C=O), 170.7 (C=O), 172.5 (C=O), 176.3 (C=O), 177.8 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  488.1927, found: 488.1955.

#### 4.6.3. Cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys)(S-propargyl) (25)

Yield: 82%; white solid;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  1.49–1.77 (m, 3H), 1.84–1.95 (m, 1H), 2.57 (dd, 1H,  $J = 16.0$  Hz,  $J = 7.0$  Hz), 2.70 (dd, 1H,  $J = 16.0$  Hz,  $J = 7.5$  Hz), 2.70 (s, 1H, H-alkyne), 2.86 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 9.0$  Hz), 2.98 (dd, 1H,  $J = 14.5$  Hz,  $J = 5.5$  Hz), 3.00–3.06 (m, 1H), 3.08 (dd, 1H,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 7.0$  Hz), 3.17 (d, 1H,  $J = 6.0$  Hz), 3.18 (d, 1H,  $J = 6.0$  Hz), 3.18–3.24 (m, 2H), 3.51 (d, 1H,  $J = 15.0$  Hz), 4.22 (d, 1H,  $J = 15.0$  Hz), 4.26 (dd, 1H,  $J = 9.0$  Hz,  $J = 5.5$  Hz), 4.38 (dd, 1H,  $J = 9.0$  Hz,  $J = 5.5$  Hz), 4.65 (dd, 1H,  $J = 9.5$  Hz,  $J = 6.5$  Hz), 4.70 (app t, 1H,  $J = 7.0$  Hz), 7.28 (bd, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-Ar), 7.32 (bt, 1H,  $J = 7.5$  Hz, H-Ar), 7.39 (bt, 2H,  $J = 7.5$  Hz, H-Ar);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 100.6 MHz)  $\delta$  18.6 ( $\text{CH}_2$ ), 24.5 ( $\text{CH}_2$ ), 27.1 ( $\text{CH}_2$ ), 31.3 ( $\text{CH}_2$ ), 36.5 ( $\text{CH}_2$ ), 37.1 ( $\text{CH}_2$ ), 40.5 ( $\text{CH}_2$ ), 43.6 ( $\text{CH}_2$ ), 50.6 (CH), 52.7 (CH), 54.2 (CH), 55.1 (CH), 72.7 (CH-alkyne), 79.8 (C-alkyne), 127.2 (CH-Ar), 128.8 (2CH-Ar), 129.2 (2CH-Ar), 136.0 (Cq-Ar), 156.7 (C=N), 171.2 (C=O), 172.3 (C=O), 172.4 (C=O), 172.5 (C=O), 172.6 (C=O), 173.3 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_7\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  617.2500, found: 617.2487.

#### 4.6.4. Cys-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>(S-propargyl) (26)

Yield: 79%; white solid;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 250 MHz)  $\delta$  0.82–1.05 (m, 12H, 4CH<sub>3</sub>), 1.20 (d, 3H,  $J = 7.0$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1.52–1.72 (m, 3H), 1.89–2.10 (m, 5H), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.20–2.30 (m, 2H), 2.47–2.67 (m, 2H), 2.70 (s, 1H, H-alkyne), 3.05–3.37 (m, 8H), 3.80–4.08 (m, 3H), 4.26 (app t, 1H,  $J = 6.5$  Hz), 4.31–4.51 (m, 4H), 4.64–4.77 (m, 2H), 7.14–7.34 (m, 4H, H-Ar), 7.52 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, H-Ar), 7.64 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, H-Ar), 8.54 (s, 1H, H-Ar);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{D}_6$ -DMSO, 100.6 MHz)  $\delta$  14.6 (CH<sub>3</sub>), 17.8 (CH<sub>3</sub>), 17.9 (CH<sub>3</sub>), 18.8 (CH<sub>3</sub>), 19.2 (CH<sub>2</sub>), 21.4 (CH<sub>3</sub>), 23.1 (CH<sub>3</sub>), 24.1 (CH), 27.8 (CH<sub>2</sub>), 28.5 (CH), 28.6 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 30.6 (CH<sub>2</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 31.5 (CH<sub>2</sub>), 32.2 (CH<sub>2</sub>), 42.0 (CH<sub>2</sub>), 48.2 (CH<sub>2</sub>), 51.3 (CH), 51.7 (CH), 51.7 (CH), 52.1 (CH), 52.2 (CH), 52.3 (CH), 53.1 (CH), 57.6 (CH), 74.2 (CH-alkyne), 80.1 (C-alkyne), 109.8 (Cq-Ar), 111.2 (CH-Ar), 118.2 (CH-Ar), 118.5 (CH-Ar), 120.8 (CH-Ar), 123.6 (CH-Ar), 123.7 (CH-Ar), 127.3 (Cq-Ar), 134.3 (2Cq-Ar), 136.0 (CH-Ar), 167.0 (C=O), 168.7 (C=O), 170.3 (C=O), 170.5 (C=O), 171.1 (C=O), 171.3 (C=O), 172.1 (C=O), 172.2 (C=O), 173.1 (C=O), 173.7 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{N}_{14}\text{O}_{10}\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1081.5070, found: 1081.5033.

#### 4.7. General method for the preparation of glycopeptides with acetylated carbohydrates

**General procedure 1:** Click reaction between protected cysteine **21** and acetylated sugars.

To a solution of the azido glycoside (100 mg, 0.12 mmol) and the S-propargyl cysteine **21** (32 mg, 0.12 mmol) in a mixture of *t*BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1 mL) was added  $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (2.3 mg, 0.012 mmol) and sodium ascorbate (4.6 mg, 0.024 mmol). The mixture was vigorously stirred at room temperature for 1 or 2 h. The reaction mixture was then diluted with ethyl acetate (100 mL) and washed with a saturated aqueous NaCl solution ( $2 \times 5$  mL), the organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel chromatography (80:20 Hex–EtOAc) to afford the pure compounds.

**General procedure 2:** Click reaction between free S-propargyl derivatives (**22** and **23**) and acetylated sugars.

To a solution of the azido glycoside (100 mg; 0.12 mmol), the propargyl derivative (0.12 mmol) and sodium ascorbate (4.6 mg, 0.024 mmol) in a mixture of *t*BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1 mL) was added  $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (2.3 mg, 0.012 mmol). The mixture immediately turned to a light green cloudy solution. The mixture was vigorously stirred at room temperature whereas the solution became limp and blue coloured. TLC showed disappearance of the starting sugar.

Chelex<sup>®</sup> 100 resin ( $\text{Na}^+$  form 1 g) was added and the mixture was stirred until the solution turned colourless and the resin turned blue. The resin was filtered off and the residue was freeze-dried. For the glutathione derivatives, the residue was purified on Sephadex<sup>®</sup> LH20 with a water/methanol 90:10 mixture as eluent.

#### 4.7.1. N-[(1,1-Dimethylethoxy)carbonyl]-S-[1-[2-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteine methyl ester (27)

Yield: 73%;  $R_f$  0.45 (Hex/EtOAc 20:80); oil;  $[\alpha]_D +1.7$  (1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3374, 1752, 1712;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.47 (s, 9H, H-Boc), 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.97 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 6.5$  Hz), 3.04 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 3.71 (ddd, 1H,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 4.5$  Hz,  $J = 2.5$  Hz), 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 2H), 3.96 (ddd, 1H,  $J = 11.0$  Hz,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 3.5$  Hz), 4.16 (dd, 1H,  $J = 12.5$  Hz,  $J = 2.5$  Hz), 4.24 (m, 1H), 4.27 (dd, 1H,  $J = 12.5$  Hz,  $J = 4.5$  Hz), 4.51 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 4.52–4.58 (m, 2H), 4.60 (ddd, 1H,  $J = 15.0$  Hz,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 5.02 (dd, 1H,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 8.0$  Hz), 5.10 (app t, 1H,  $J = 10.0$  Hz), 5.20 (app t, 1H,  $J = 10.0$  Hz), 5.50 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz), 7.57 (s, 1H, H-triazole);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz)  $\delta$  21.0 (2CH<sub>3</sub>), 21.1 (CH<sub>3</sub>), 21.2 (CH<sub>3</sub>), 27.1 (CH<sub>2</sub>), 28.7 (CH<sub>3</sub>-Boc), 34.5 (CH<sub>2</sub>), 50.5 (CH<sub>2</sub>), 53.0 (OCH<sub>3</sub>), 53.8 (CH), 62.1 (CH<sub>2</sub>), 68.1 (CH<sub>2</sub>), 68.6 (CH), 71.3 (CH), 72.4 (CH), 72.9 (CH), 80.5 (C-Boc), 101.0 (CH-anomer), 123.7 (CH), 145.3 (C), 155.6 (C=O), 169.7 (C=O), 169.8 (C=O), 170.5 (C=O), 171.0 (C=O), 172.0 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{SNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  713.2310, found: 713.2351.

#### 4.7.2. N-[(1,1-Dimethylethoxy)carbonyl]-S-[1-[2-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteine methyl ester (28)

Yield: 90%;  $R_f$  0.46 (Hex/EtOAc 20:80); oil;  $[\alpha]_D +19.0$  (1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3370, 1748;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1.46 (s, 9H, H-Boc), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.97 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 7.5$  Hz), 3.03 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 6.5$  Hz), 3.60 (ddd, 1H,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz,  $J = 2.5$  Hz), 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 2H), 3.84–3.94 (m, 1H), 4.05 (dd, 1H,  $J = 12.5$  Hz,  $J = 2.5$  Hz), 4.13–4.17 (m, 1H), 4.24 (dd, 1H,  $J = 12.5$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 4.53–4.65 (m, 3H), 4.80 (d, 1H,  $J = 1.0$  Hz), 5.20 (dd, 1H,  $J = 3.0$  Hz,  $J = 1.0$  Hz), 5.22 (dd, 1H,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 3.0$  Hz), 5.26 (app t, 1H,  $J = 1.0$  Hz), 5.53 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.65 (s, 1H, H-triazole);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz)  $\delta$  21.1 (3CH<sub>3</sub>), 21.2 (CH<sub>3</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub>), 28.7 (CH<sub>3</sub>-Boc), 34.4 (CH<sub>2</sub>), 50.1 (CH<sub>2</sub>), 53.0 (OCH<sub>3</sub>), 53.8 (CH), 62.6 (CH<sub>2</sub>), 66.1 (CH), 66.6 (CH<sub>2</sub>), 69.2 (CH), 69.5 (CH), 69.6 (C-Boc), 80.5 (C-anomer), 97.9 (CH-anomer), 123.6 (CH-triazole), 145.7 (C-triazole), 155.6 (C=O), 170.0 (C=O), 170.4 (C=O), 170.4 (C=O), 171.0 (C=O), 172.0 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{NaO}_{14}\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  713.2310, found: 713.2314.

#### 4.7.3. N-[(1,1-Dimethylethoxy)carbonyl]-S-[1-[2-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteine methyl ester (29)

Yield: 73%;  $R_f$  0.43 (Hex/EtOAc 20:80); oil;  $[\alpha]_D -2.6$  (1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR: film ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3374, 1752, 1712;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  1.47 (s, 9H, H-Boc), 2.00 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.99 (dd, 1H,  $J = 14.5$  Hz,  $J = 6.5$  Hz), 3.05 (dd, 1H,  $J = 14.5$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 2H), 3.90–3.99 (m, 2H), 4.13 (dd, 1H,  $J = 12.0$  Hz,  $J = 7.0$  Hz), 4.19 (dd, 1H,  $J = 12.0$  Hz,  $J = 7.0$  Hz), 4.26 (app dt, 1H,  $J = 11.0$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 4.47 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 4.49–4.58 (m, 2H), 4.62 (app dt, 1H,  $J = 15.0$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 5.01 (dd, 1H,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 2.5$  Hz), 5.21 (dd, 1H,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 2.5$  Hz), 5.41 (bd, 1H,  $J = 10.5$  Hz), 5.51 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz), 7.58 (s, 1H, H-triazole);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  20.9 (CH<sub>3</sub>), 21.1 (2CH<sub>3</sub>), 21.2 (CH<sub>3</sub>), 27.1 (CH<sub>2</sub>), 28.7

(CH<sub>2</sub>-Boc), 34.6 (CH<sub>2</sub>), 50.5 (CH<sub>2</sub>), 53.0 (OCH<sub>3</sub>), 53.8 (CH), 61.6 (CH<sub>2</sub>), 67.3 (CH), 67.9 (CH<sub>2</sub>), 68.9 (CH), 71.0 (CH), 71.3 (CH), 80.5 (C-Boc), 101.4 (CH-anomer), 123.7 (CH-triazole), 145.3 (C-triazole), 155.6 (C=O), 169.9 (C=O), 170.4 (C=O), 170.5 (C=O), 170.8 (C=O), 172.0 (C=O); HRMS *m/z* (ESI) calcd for C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>14</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 713.2310, found: 713.2336.

**4.7.4. S-[1-[2-[(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteine (30)**

Yield: 70%; white solid;  $[\alpha]_D$  -8.0 (1.1, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.99 (dd, 1H, *J* = 15.0 Hz, *J* = 7.5 Hz), 3.08 (dd, 1H, *J* = 15.0 Hz, *J* = 4.5 Hz), 3.91 (s, 2H), 3.90–3.95 (m, 1H), 4.00–4.05 (m, 1H), 4.13 (dd, 1H, *J* = 13.0 Hz, *J* = 2.0 Hz), 4.15–4.20 (m, 1H), 4.28–4.32 (m, 1H), 4.36 (dd, 1H, *J* = 13.0 Hz, *J* = 4.0 Hz), 4.62 (m, 2H), 4.77 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 4.87 (dd, 1H, *J* = 9.5 Hz, *J* = 8.0 Hz), 5.07 (app t, 1H, *J* = 9.5 Hz), 5.28 (app t, 1H, *J* = 9.5 Hz), 7.98 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  20.0 (CH<sub>3</sub>), 20.0 (CH<sub>3</sub>), 20.1 (2CH<sub>3</sub>), 25.0 (CH<sub>2</sub>), 31.8 (CH<sub>2</sub>), 50.1 (CH<sub>2</sub>), 53.4 (CH), 61.8 (CH<sub>2</sub>), 67.9 (CH<sub>2</sub>), 68.2 (CH), 71.1 (CH), 71.3 (CH), 73.0 (CH), 99.9 (CH-anomer), 124.6 (CH-triazole), 144.2 (C-triazole), 172.4 (C=O), 172.6 (C=O), 172.7 (C=O), 173.1 (C=O), 173.9 (C=O); HRMS *m/z* (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 577.1810, found: 577.1847.

**4.7.5. S-[1-[2-[(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteine (31)**

Yield: 75%; white solid;  $[\alpha]_D$  +26.8 (0.74, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.03 (dd, 1H, *J* = 15.0 Hz, *J* = 7.5 Hz), 3.13 (dd, 1H, *J* = 15.0 Hz, *J* = 4.0 Hz), 3.20 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.96 (dd, 1H, *J* = 7.5 Hz, *J* = 4.0 Hz), 3.98–4.06 (m, 2H), 4.10–4.13 (m, 1H), 4.27 (dd, 1H, *J* = 12.5 Hz, *J* = 4.0 Hz), 4.70–4.75 (m, 2H), 4.95 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 5.11 (dd, 1H, *J* = 10.0 Hz, *J* = 3.5 Hz), 5.21 (app t, 1H, *J* = 10.0 Hz), 5.26 (dd, 1H, *J* = 3.5 Hz, *J* = 1.5 Hz), 8.15 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  20.1 (2CH<sub>3</sub>), 25.3 (CH<sub>2</sub>), 32.4 (CH<sub>2</sub>), 50.3 (CH<sub>2</sub>), 53.7 (CH), 62.1 (CH<sub>2</sub>), 65.7 (CH), 66.2 (CH<sub>2</sub>), 68.4 (CH), 69.5 (CH), 69.9 (CH), 96.9 (CH-anomer), 125.6 (CH-triazole), 145.0 (C-triazole), 172.9 (C=O), 173.0 (C=O), 173.1 (C=O), 173.3 (C=O), 173.9 (C=O); HRMS *m/z* (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>12</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 577.1810, found: 577.1855.

**4.7.6. S-[1-[2-[(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteine (32)**

Yield: 62%; white solid;  $[\alpha]_D$  -5.0 (0.4, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  1.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.87–3.16 (m, 2H), 3.85–3.91 (m, 1H), 3.91 (s, 2H), 4.12 (ddd, 1H, *J* = 11.0 Hz, *J* = 8.0 Hz, *J* = 4.0 Hz), 4.20 (s, 3H), 4.30 (ddd, 1H, *J* = 11.0 Hz, *J* = 8.0 Hz, *J* = 4.0 Hz), 4.60–4.65 (m, 2H), 4.74 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 4.98 (dd, 1H, *J* = 10.0 Hz, *J* = 8.0 Hz), 5.16 (dd, 1H, *J* = 10.0 Hz, *J* = 3.0 Hz), 5.43 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz), 7.97 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  20.3 (2CH<sub>3</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>), 25.4 (CH<sub>2</sub>), 32.2 (CH<sub>2</sub>), 50.5 (CH<sub>2</sub>), 53.7 (CH), 62.2 (CH<sub>2</sub>), 68.2 (CH<sub>2</sub>), 68.3 (CH), 69.6 (CH), 70.9 (CH), 71.3 (CH), 100.5 (CH-anomer), 125.0 (CH-triazole), 144.6 (C-triazole), 173.0 (C=O), 173.0 (C=O), 173.6 (C=O), 173.8 (C=O); HRMS *m/z* (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 577.1810, found: 577.1857.

**4.7.7. L- $\gamma$ -Glutamyl-S-[1-[2-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteinyglycine (33)**

Yield: 83%; white solid;  $[\alpha]_D$  -11.0 (1.1, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.50–2.55 (m, 2H), 2.85 (dd, 1H, *J* = 14.0 Hz, *J* = 9.0 Hz), 3.04 (dd, 1H, *J* = 14.0 Hz, *J* = 5.0 Hz), 3.72 (d, 1H, *J* = 17.0 Hz), 3.75–3.80 (m, 1H), 3.80 (d, 1H, *J* = 17.0 Hz), 3.89 (s, 2H), 4.01 (ddd, 1H, *J* = 10.0 Hz, *J* = 3.5 Hz, *J* = 2.0 Hz), 4.12 (ddd, 1H, *J* = 11.5 Hz, *J* = 7.0 Hz, *J* = 4.5 Hz), 4.18 (dd, 1H, *J* = 12.5 Hz,

*J* = 2.0 Hz), 4.29 (m, 1H), 4.36 (dd, 1H, *J* = 12.5 Hz, *J* = 3.5 Hz), 4.55 (dd, 1H, *J* = 9.0 Hz, *J* = 5.0 Hz), 4.63 (m, 2H), 4.75 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 4.89 (dd, 1H, *J* = 9.5 Hz, *J* = 8.0 Hz), 5.07 (app t, 1H, *J* = 10.0 Hz), 5.28 (dd, 1H, *J* = 10.0 Hz, *J* = 9.5 Hz), 7.97 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  20.4 (CH<sub>3</sub>), 20.4 (CH<sub>3</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>), 25.6 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 31.8 (CH<sub>2</sub>), 33.1 (CH<sub>2</sub>), 43.7 (CH<sub>2</sub>), 50.4 (CH<sub>2</sub>), 53.1 (CH), 54.5 (CH), 62.1 (CH<sub>2</sub>), 68.4 (CH<sub>2</sub>), 68.5 (CH), 71.4 (CH), 71.6 (CH), 73.2 (CH), 100.3 (CH-anomer), 124.7 (CH-triazole), 145.0 (C-triazole), 172.1 (C=O), 172.7 (C=O), 173.1 (C=O), 173.4 (C=O), 174.1 (C=O), 174.3 (C=O), 175.2 (C=O), 176.5 (C=O); HRMS *m/z* (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>43</sub>N<sub>6</sub>O<sub>16</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 763.2451, found: 763.2454.

**4.7.8. L- $\gamma$ -Glutamyl-S-[1-[2-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteinyglycine (34)**

Yield: 85%; white solid;  $[\alpha]_D$  +6.7 (0.2, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 250 MHz)  $\delta$  1.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.40–2.45 (m, 2H), 2.75 (dd, 1H, *J* = 14.0 Hz, *J* = 9.0 Hz), 2.95–3.00 (m, 2H), 3.10–3.17 (m, 2H), 3.60–4.20 (m, 8H), 4.14 (dd, 1H, *J* = 12.5 Hz, *J* = 4.0 Hz), 4.45 (dd, 1H, *J* = 9.0 Hz, *J* = 5.0 Hz), 4.60 (m, 2H), 4.82 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 4.94–5.17 (m, 3H), 8.01 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 62.9 MHz)  $\delta$  20.3 (3CH<sub>3</sub>), 20.4 (CH<sub>3</sub>), 25.4 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 33.2 (CH<sub>2</sub>), 43.6 (CH<sub>2</sub>), 50.1 (CH<sub>2</sub>), 53.0 (CH), 54.3 (CH), 62.0 (CH<sub>2</sub>), 65.6 (CH), 66.0 (CH<sub>2</sub>), 68.2 (CH), 69.4 (CH), 69.8 (CH), 96.7 (CH-anomer), 125.3 (CH-triazole), 145.2 (C-triazole), 171.9 (C=O), 172.8 (C=O), 172.9 (C=O), 173.1 (C=O), 173.7 (C=O), 174.1 (C=O), 175.0 (C=O), 176.3 (C=O); HRMS *m/z* (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>43</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>16</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 763.2451, found: 763.2474.

**4.7.9. L- $\gamma$ -Glutamyl-S-[1-[2-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteinyglycine (35)**

Yield: 60%; white solid;  $[\alpha]_D$  -14.0 (1.0, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.14–2.30 (m, 2H), 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.50–2.65 (m, 2H), 2.88 (m, 1H), 3.02 (m, 1H), 3.93 (s, 2H), 4.01 (s, 2H), 4.08 (m, 1H), 4.13 (m, 1H), 4.19 (s, 3H), 4.25–4.30 (m, 1H), 4.55–4.58 (m, 2H), 4.60–4.65 (m, 1H), 4.73 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 4.97 (dd, 1H, *J* = 10.0 Hz, *J* = 8.0 Hz), 5.16 (app t, 1H, *J* = 10.0 Hz), 5.42 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz), 7.99 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  20.3 (2CH<sub>3</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>), 25.8 (CH<sub>2</sub>), 26.0 (CH<sub>2</sub>), 31.3 (CH<sub>2</sub>), 33.3 (CH<sub>2</sub>), 41.5 (CH<sub>2</sub>), 50.7 (CH<sub>2</sub>), 52.7 (CH), 53.0 (CH), 62.2 (CH<sub>2</sub>), 68.1 (CH<sub>2</sub>), 68.3 (CH), 69.6 (CH), 70.9 (CH), 71.3 (CH), 100.7 (CH-anomer), 125.2 (CH-triazole), 144.7 (C-triazole), 172.9 (C=O), 172.9 (C=O), 173.0 (C=O), 173.2 (2C=O), 173.6 (C=O), 173.9 (C=O), 174.6 (C=O); HRMS *m/z* (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>43</sub>N<sub>6</sub>O<sub>16</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 763.2451, found: 763.2510.

**4.8. General method for the preparation of glycopeptides with free carbohydrates**

To a solution of S-propargyl derivative (0.1 mmol), of the azido sugar (0.1 mmol) and sodium ascorbate (4 mg, 0.02 mmol) in water (2 mL) was added, at room temperature a solution of Cu(OAc)<sub>2</sub> (2 mg, 0.01 mmol) in water (0.3 mL). The solution turned immediately pale green. The reaction was stopped when the intense blue color reappeared. Chelex resin (250 mg) was then added to the blue solution and the suspension was stirred until the solution turned colorless. The resin was filtered off and the resulting solution was freeze-dried. Purification was achieved by LH20 gel filtration. Elution with water provided pure triazole.

For c(RGDfC) and CQWAVGHLM only 1 mg of these peptides was introduced, proportion of other reactive was respected. In the case of CQWAVGHLM the reaction proceeded in 2 mL of a water/MeOH (50:50) solution.

**4.8.1. L- $\gamma$ -Glutamyl-S-[1-[2-[( $\beta$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteinyl-glycine (36)**

Yield: 66%; white solid;  $[\alpha]_D -20.4$  (0.4, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  2.15–2.20 (m, 2H), 2.50–2.55 (m, 2H), 2.88 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 8.0$  Hz), 3.08 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 3.27 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 8.5$  Hz), 3.36–3.55 (m, 3H), 3.69 (dd, 1H,  $J = 13.0$  Hz,  $J = 6.0$  Hz), 3.75–3.95 (m, 6H), 4.15 (m, 1H), 4.33 (m, 2H), 4.45 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H-anomer), 4.56 (dd, 1H,  $J = 9.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 4.70–4.75 (m, 1H), 8.08 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  25.6 (CH<sub>2</sub>), 26.5 (CH<sub>2</sub>), 31.7 (CH<sub>2</sub>), 33.1 (CH<sub>2</sub>), 43.7 (CH<sub>2</sub>), 50.7 (CH<sub>2</sub>), 53.1 (CH), 54.4 (CH), 61.0 (CH<sub>2</sub>), 68.4 (CH<sub>2</sub>), 69.9 (CH), 73.3 (CH), 75.9 (CH), 76.2 (CH), 102.7 (CH-anomer), 125.1 (CH-triazole), 145.1 (C-triazole), 172.2 (C=O), 174.3 (C=O), 175.3 (C=O), 176.4 (C=O); <sup>19</sup>F NMR (D<sub>2</sub>O, 235 MHz)  $\delta$  -234.0; HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>N<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>12</sub>S [M-H+2Na]<sup>+</sup> 639.1673, found: 639.1672.

**4.8.2. L- $\gamma$ -Glutamyl-S-[1-[2-[( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteinyl-glycine (37)**

Yield: 62%; white solid;  $[\alpha]_D -3.5$  (0.4, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  2.10–2.15 (m, 2H), 2.48–2.53 (m, 2H), 2.82–2.86 (m, 1H), 3.02–3.07 (m, 2H), 3.59 (app t, 1H,  $J = 9.5$  Hz), 3.61–4.00 (m, 1H), 4.10–4.15 (m, 1H), 4.54 (dd, 1H,  $J = 9.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 4.62–4.67 (m, 2H), 8.03 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  25.6 (CH<sub>2</sub>), 27.1 (CH<sub>2</sub>), 31.8 (CH<sub>2</sub>), 33.1 (CH<sub>2</sub>), 43.7 (CH<sub>2</sub>), 50.5 (CH<sub>2</sub>), 53.1 (CH), 54.6 (CH), 61.0 (CH<sub>2</sub>), 65.8 (CH<sub>2</sub>), 66.7 (CH), 70.2 (CH), 70.7 (CH), 73.1 (CH), 99.9 (CH-anomer), 125.0 (CH-triazole), 145.3 (C-triazole), 172.2 (C=O), 175.3 (C=O), 175.4 (C=O), 176.6 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>S [M-H]<sup>-</sup> 593.1883, found: 593.1905.

**4.8.3. L- $\gamma$ -Glutamyl-S-[1-[2-[( $\alpha$ -D-galactopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteinyl-glycine (38)**

Yield: 55%; white solid;  $[\alpha]_D -14.2$  (0.6, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  2.10–2.15 (m, 2H), 2.50–2.55 (m, 2H), 2.84 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 8.0$  Hz), 3.05 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 3.48 (dd, 1H,  $J = 9.0$  Hz,  $J = 8.0$  Hz), 3.60–3.80 (m, 8H), 3.88–3.93 (m, 3H), 4.10–4.15 (m, 1H), 4.25–4.30 (m, 1H), 4.35 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H-anomer), 4.51 (dd, 1H,  $J = 9.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 4.70–4.75 (m, 1H), 8.05 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  25.6 (CH<sub>2</sub>), 26.9 (CH<sub>2</sub>), 31.8 (CH<sub>2</sub>), 33.1 (CH<sub>2</sub>), 43.7 (CH<sub>2</sub>), 50.7 (CH<sub>2</sub>), 53.1 (CH), 54.6 (CH), 61.3 (CH<sub>2</sub>), 68.4 (CH<sub>2</sub>), 68.9 (CH), 70.9 (CH), 73.0 (CH), 75.5 (CH<sub>2</sub>), 103.4 (CH-anomer), 125.2 (CH-triazole), 145.1 (C-triazole), 172.2 (C=O), 175.0 (C=O), 175.3 (C=O), 176.6 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>S [M-2H]<sup>2-</sup> 296.0905, found: 296.0920.

**4.8.4. L- $\gamma$ -Glutamyl-S-[1-[2-[( $\alpha$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteinyl-glycine (39)**

Yield: 67%; white solid; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 250 MHz)  $\delta$  2.16 (dd, 2H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 7.5$  Hz), 2.50–2.55 (m, 2H), 2.85–2.94 (m, 1H), 3.03–3.10 (m, 1H), 3.34 (app t, 1H,  $J = 9.5$  Hz), 3.47–3.60 (m, 3H), 3.62–3.67 (m, 1H), 3.75–3.80 (m, 3H), 3.87–4.00 (m, 3H), 4.08–4.16 (m, 1H), 4.26–4.36 (m, 1H), 4.50–4.58 (m, 1H), 4.64–4.74 (m, 2H), 4.88 (d, 1H,  $J = 3.5$  Hz), 8.08 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  25.2 (CH<sub>2</sub>), 26.1 (CH<sub>2</sub>), 31.3 (CH<sub>2</sub>), 32.8 (CH<sub>2</sub>), 45.1 (CH<sub>2</sub>), 50.1 (CH<sub>2</sub>), 52.8 (CH), 54.6 (CH), 60.1 (CH<sub>2</sub>), 65.9 (CH<sub>2</sub>), 69.1 (CH), 71.1 (CH), 71.8 (CH), 72.8 (CH), 98.0 (CH-anomer), 124.9 (CH-triazole), 145.5 (C-triazole), 171.9 (C=O), 173.3 (C=O), 174.8 (C=O), 176.3 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 595.2028, found: 595.2052.

**4.8.5. L- $\gamma$ -Glutamyl-S-[1-[2-[(6-deoxy-6-fluoro- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteinyl-glycine (40)**

Yield: 80%; white solid;  $[\alpha]_D +4.1$  (0.5, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  2.23 (q, 2H,  $J = 7.5$  Hz), 2.55–2.62 (m, 2H), 2.93 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 9.5$  Hz), 3.12 (dd, 1H,  $J = 4.5$  Hz), 3.16–3.20 (m,

1H), 3.70–3.80 (m, 3H), 3.81–3.89 (m, 3H), 3.92–3.99 (m, 4H), 4.00–4.06 (m, 1H), 4.13–4.20 (m, 1H), 4.53–4.75 (m, 3H), 4.88 (bs, 1H), 8.10 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  25.6 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 31.8 (CH<sub>2</sub>), 33.2 (CH<sub>2</sub>), 43.7 (CH<sub>2</sub>), 50.5 (CH<sub>2</sub>), 53.2 (CH), 54.6 (CH), 65.6 (d,  $J_{C,F} = 7.3$  Hz, CH), 66.2 (CH<sub>2</sub>), 70.2 (CH), 70.7 (CH), 71.9 (d,  $J_{C,F} = 17.5$  Hz, CH), 82.6 (d,  $J_{C,F} = 167.8$  Hz, CH<sub>2</sub>), 100.2 (CH-anomer), 125.1 (CH-triazole), 145.0 (C-triazole), 172.2 (C=O), 174.3 (C=O), 175.3 (C=O), 176.4 (C=O); <sup>19</sup>F NMR (D<sub>2</sub>O, 235 MHz)  $\delta$  -234.0; HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>11</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 597.1990, found: 597.2012.

**4.8.6. L- $\gamma$ -Glutamyl-S-[1-[2-[(6-deoxy-6-fluoro- $\beta$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteinyl-glycine (41)**

Yield: 55%; white solid;  $[\alpha]_D -18.3$  (0.5, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  2.21 (q, 2H,  $J = 7.0$  Hz), 2.54–2.60 (m, 2H), 2.91 (dd, 1H,  $J = 15.0$  Hz,  $J = 8.0$  Hz), 3.18 (dd, 1H,  $J = 15.0$  Hz,  $J = 4.5$  Hz), 3.28–3.33 (m, 1H), 3.48–3.68 (m, 4H), 3.65–3.85 (m, 3H), 3.91–3.98 (m, 2H), 4.16–4.25 (m, 1H), 4.30–4.40 (m, 1H), 4.49 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz), 4.56–4.62 (m, 1H), 4.72 (dd, 2H,  $J_{H,F} = 47.5$  Hz,  $J = 2.0$  Hz), 4.70–4.74 (m, 1H), 8.09 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  25.7 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 31.8 (CH<sub>2</sub>), 33.2 (CH<sub>2</sub>), 50.8 (CH<sub>2</sub> and CH), 53.2 (CH<sub>2</sub> and CH), 68.7 (CH<sub>2</sub> and CH), 73.3 (CH), 74.8 (d,  $J_{C,F} = 17.4$  Hz, CH), 75.8 (CH), 82.3 (d,  $J_{C,F} = 165.5$  Hz, CH<sub>2</sub>), 102.9 (CH-anomer), 125.4 (CH-triazole), 145.9 (C-triazole), 172.2 (C=O), 174.3 (C=O), 175.3 (C=O), 176.5 (C=O); <sup>19</sup>F NMR (D<sub>2</sub>O, 235 MHz)  $\delta$  -235.2 (td,  $J = 47.0$  Hz,  $J = 26.0$  Hz); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>11</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 597.1990, found: 597.2005.

**4.8.7. L- $\gamma$ -Glutamyl-S-[1-[2-[(6-deoxy-6-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-L-cysteinyl-glycine (42)**

Yield: 69%; white solid;  $[\alpha]_D +18.7$  (0.05, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  2.21 (dd, 2H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 7.5$  Hz), 2.50–2.56 (m, 2H), 2.82–3.11 (m, 3H), 3.41 (dd, 1H,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 9.0$  Hz), 3.52 (dd, 1H,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 3.5$  Hz), 3.58 (app t, 1H,  $J = 9$  Hz), 3.73–3.84 (m, 3H), 3.87–3.93 (m, 2H), 4.00 (app dt, 1H,  $J = 11.0$  Hz,  $J = 3.5$  Hz), 4.12 (ddd, 1H,  $J = 11.5$  Hz,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 4.39–4.76 (m, 5H), 4.92 (d, 1H,  $J = 3.5$  Hz), 8.08 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  25.2 (CH<sub>2</sub>), 26.1 (CH<sub>2</sub>), 31.3 (CH<sub>2</sub>), 32.8 (CH<sub>2</sub>), 50.1 (CH<sub>2</sub> and CH), 52.8 (CH), 66.2 (CH<sub>2</sub> and CH), 68.1 (d,  $J_{C,F} = 6.5$  Hz, CH), 70.6 (d,  $J_{C,F} = 17.5$  Hz, CH), 71.0 (CH), 72.6 (CH), 82.0 (d,  $J_{C,F} = 167.0$  Hz, CH<sub>2</sub>), 98.1 (CH-anomer), 129.7 (CH-triazole), 145.3 (C-triazole), 171.9 (2C=O), 174.8 (2C=O); <sup>19</sup>F NMR (D<sub>2</sub>O, 235 MHz)  $\delta$  -235.2 (td,  $J = 47.5$  Hz,  $J = 28.5$  Hz); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>11</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 597.1990, found: 597.2004.

**4.8.8. Arg-Gly-Asp-Cys-S-[1-[2-[( $\beta$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl (43)**

Yield: 71%; white solid;  $[\alpha]_D -9.6$  (0.5, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  1.58–1.70 (m, 2H), 1.85–1.97 (m, 2H), 2.49–2.61 (m, 1H), 2.62–3.00 (m, 3H), 3.11–3.19 (m, 3H), 3.25–3.40 (m, 3H), 3.61 (dd, 1H,  $J = 12.5$  Hz,  $J = 5.5$  Hz), 3.80 (dd, 2H,  $J = 12.5$  Hz,  $J = 2.0$  Hz), 3.88 (d, 2H,  $J = 16.5$  Hz), 4.01–4.10 (m, 3H), 4.20–4.30 (m, 2H), 4.34 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 4.53–4.62 (m, 3H), 8.03 (s, 1H, H-triazole); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz)  $\delta$  23.4 (CH<sub>2</sub>), 25.5 (CH<sub>2</sub>), 28.0 (CH<sub>2</sub>), 33.4 (CH<sub>2</sub>), 37.9 (CH<sub>2</sub>), 40.4 (CH<sub>2</sub>), 42.5 (CH<sub>2</sub>), 50.4 (CH<sub>2</sub>), 51.7 (CH<sub>2</sub>), 60.7 (CH<sub>2</sub>), 68.0 (CH), 69.5 (CH), 71.1 (CH), 72.9 (CH), 75.6 (CH), 75.9 (2CH), 102.4 (CH-anomer), 125.2 (CH-triazole), 145.3 (C-triazole), 156.7 (C=N), 170.7 (C=O), 171.6 (C=O), 172.5 (C=O), 176.2 (C=O), 178.5 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 737.2888, found: 737.2888.

**4.8.9. Arg-Gly-Asp-Cys-S-[1-[2-[( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl (44)**

Yield: 63%; white solid;  $[\alpha]_D +4.1$  (0.5, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  1.59–1.69 (m, 2H), 1.82–1.97 (m, 2H), 2.53 (dd, 1H,  $J = 15.5$  Hz,  $J = 8.5$  Hz), 2.62–2.70 (m, 1H), 2.75–2.97 (m, 2H),



2.98–3.05 (m, 1H), 3.14 (app t, 2H,  $J = 7.0$  Hz), 3.51 (app t, 1H,  $J = 9.5$  Hz), 3.58 (dd, 2H,  $J = 13.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 3.67 (dd, 1H,  $J = 12.0$  Hz,  $J = 2.5$  Hz), 3.76–3.92 (m, 6H), 3.99–4.10 (m, 3H), 4.25–4.32 (m, 1H), 4.54–4.62 (m, 3H), 8.01 (s, 1H, H-triazole);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  23.4 ( $\text{CH}_2$ ), 25.5 ( $\text{CH}_2$ ), 28.0 ( $\text{CH}_2$ ), 33.6 ( $\text{CH}_2$ ), 38.2 ( $\text{CH}_2$ ), 40.4 ( $\text{CH}_2$ ), 42.5 ( $\text{CH}_2$ ), 50.2 ( $\text{CH}_2$ ), 51.7 ( $\text{CH}_2$ ), 60.7 ( $\text{CH}_2$ ), 65.4 (CH), 66.4 (CH), 69.3 (CH), 69.9 (CH), 70.4 (CH), 72.8 (2CH), 99.6 (CH-anomer), 125.0 (CH-triazole), 145.0 (C-triazole), 156.8 (C=N), 170.2 (C=O), 170.7 (C=O), 172.5 (C=O), 176.2 (C=O), 177.1 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  737.2888, found: 737.2903.

**4.8.10. Arg-Gly-Asp-Cys-S-[[1-[2-[( $\beta$ -D-galactopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl] (45)**

Yield: 52%; white solid;  $[\alpha]_{\text{D}} -14.8$  (0.4,  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  1.62–1.66 (m, 2H), 1.70–1.75 (m, 2H), 2.61 (dd, 1H,  $J = 16.0$  Hz,  $J = 8.0$  Hz), 2.74 (dd, 1H,  $J = 16.0$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 2.86 (dd, 1H,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 2.96–3.00 (m, 1H), 3.18–3.29 (m, 3H), 3.46–3.51 (m, 1H), 3.56–3.80 (m, 2H), 3.84–3.98 (m, 5H), 4.06–4.15 (m, 3H), 4.26–4.38 (m, 4H), 4.64–4.70 (m, 2H), 8.04 (s, 1H, H-triazole);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  24.3 ( $\text{CH}_2$ ), 25.6 ( $\text{CH}_2$ ), 30.9 ( $\text{CH}_2$ ), 33.7 ( $\text{CH}_2$ ), 38.6 ( $\text{CH}_2$ ), 41.1 ( $\text{CH}_2$ ), 42.7 ( $\text{CH}_2$ ), 50.7 ( $\text{CH}_2$ ), 51.8 (CH), 54.2 (CH), 54.7 (CH), 61.3 ( $\text{CH}_2$ ), 68.3 ( $\text{CH}_2$ ), 68.9 (CH), 70.9 (CH), 73.0 (CH), 75.5 (CH), 103.4 (CH-anomer), 125.2 (CH-triazole), 145.2 (C-triazole), 157.1 (C=N), 171.4 (C=O), 172.9 (C=O), 176.7 (C=O), 178.0 (C=O), 178.3 (C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_{10}\text{NaO}_{13}\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  759.2708, found: 759.2703.

**4.8.11. Arg-Gly-Asp-Cys-S-[[1-[2-[(6-deoxy-6-fluoro- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl] (46)**

Yield: 68%; white solid;  $[\alpha]_{\text{D}} +4.6$  (0.5,  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  1.58–1.69 (m, 2H), 1.85–1.96 (m, 2H), 2.53 (dd, 1H,  $J = 16.5$  Hz,  $J = 7.5$  Hz), 2.66 (dd, 1H,  $J = 16.5$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 2.70 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 8.5$  Hz), 2.91 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 2.96–3.08 (m, 1H), 3.14 (app t, 2H,  $J = 7.0$  Hz), 3.57–3.62 (m, 2H), 3.78–3.82 (m, 2H), 3.84–3.92 (m, 3H), 3.98–4.10 (m, 3H), 4.27 (dd, 1H,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 4.38–4.54 (m, 2H), 4.55–4.62 (m, 3H), 4.73 (d, 1H,  $J = 1.1$  Hz), 8.02 (s, 1H, H-triazole);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  23.4 ( $\text{CH}_2$ ), 25.5 ( $\text{CH}_2$ ), 27.9 ( $\text{CH}_2$ ), 33.6 ( $\text{CH}_2$ ), 38.3 ( $\text{CH}_2$ ), 40.3 ( $\text{CH}_2$ ), 42.5 ( $\text{CH}_2$ ), 50.1 ( $\text{CH}_2$ ), 51.6 (CH), 52.8 (CH), 54.2 (CH), 65.2 (d,  $J_{\text{C,F}} = 7.8$  Hz, CH), 65.7 (CH), 69.7 ( $\text{CH}_2$ ), 70.2 (CH), 71.5 (d,  $J_{\text{C,F}} = 18.2$  Hz, CH), 82.0 (d,  $J_{\text{C,F}} = 169.0$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 99.8 (CH-anomer), 124.7 (CH-triazole), 145.0 (C-triazole), 156.8 (C=N), 170.1 (C=O), 170.7 (C=O), 172.5 (C=O), 176.2 (C=O), 177.8 (C=O);  $^{19}\text{F}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 235 MHz)  $\delta$  -234.0 (td,  $J = 47.0$  Hz,  $J = 27.0$  Hz); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{FN}_{10}\text{O}_{12}\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  739.2845, found: 739.2831.

**4.8.12. Arg-Gly-Asp-Cys-S-[[1-[2-[(6-deoxy-6-fluoro- $\beta$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl] (47)**

Yield: 67%; white solid;  $[\alpha]_{\text{D}} -25.1$  (0.3,  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  1.71–1.76 (m, 2H), 1.94–1.98 (m, 2H), 2.61 (dd, 1H,  $J = 16.0$  Hz,  $J = 8.0$  Hz), 2.74 (dd, 1H,  $J = 16.0$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 2.86 (dd, 1H,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 2.95–3.00 (m, 1H), 3.18–3.29 (m, 3H), 3.43–3.60 (m, 3H), 3.86 (s, 2H), 3.97 (d, 1H,  $J = 10.0$  Hz), 4.06–4.28 (m, 3H), 4.24–4.38 (m, 3H), 4.44 (d, 1H,  $J = 5.0$  Hz), 4.60–4.74 (m, 3H), 8.01 (s, 1H, H-triazole);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  23.7 ( $\text{CH}_2$ ), 25.6 ( $\text{CH}_2$ ), 28.3 ( $\text{CH}_2$ ), 33.7 ( $\text{CH}_2$ ), 38.5 ( $\text{CH}_2$ ), 40.7 ( $\text{CH}_2$ ), 42.8 ( $\text{CH}_2$ ), 50.7 ( $\text{CH}_2$ ), 52.0 ( $\text{CH}_2$ ), 53.2 (CH), 54.6 (CH), 68.5 (CH), 73.2 ( $\text{CH}_2$ ), 74.6 (CH), 75.7 (CH), 81.4 (CH), 83.0 (CH), 102.9 (CH-anomer), 125.2 (CH-triazole), 145.3 (C-triazole), 157.1 (C=N), 170.5 (C=O), 171.1 (C=O), 172.9 (C=O), 176.7 (C=O), 178.2 (C=O);  $^{19}\text{F}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 235 MHz)  $\delta$  -235 (td,  $J = 46.0$  Hz,  $J = 24.0$  Hz); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{FN}_{10}\text{O}_{12}\text{S}$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  737.2688, found: 737.2710.

**4.8.13. Arg-Gly-Asp-Cys-S-[[1-[2-[(6-deoxy-6-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl] (48)**

Yield: 57%; white solid;  $[\alpha]_{\text{D}} +12.4$  (0.045,  $\text{H}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  1.65–1.79 (m, 2H), 1.92–2.03 (m, 2H), 2.62 (dd, 1H,  $J = 16.5$  Hz,  $J = 9.0$  Hz), 2.75 (dd, 1H,  $J = 16.5$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 2.89 (dd, 1H,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 7.0$  Hz), 2.92–3.04 (m, 1H), 3.23 (app t, 2H,  $J = 6.5$  Hz), 3.41 (app t, 1H,  $J = 9.5$  Hz), 3.52 (dd, 1H,  $J = 9.5$  Hz,  $J = 3.5$  Hz), 3.59 (app t, 2H,  $J = 9.5$  Hz), 3.84–3.91 (m, 2H), 3.94–4.03 (m, 2H), 4.05–4.19 (m, 3H), 4.34–4.57 (m, 3H), 4.62–4.72 (m, 3H), 4.92 (d, 1H,  $J = 3.5$  Hz), 8.06 (s, 1H, H-triazole);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  23.4 ( $\text{CH}_2$ ), 25.3 ( $\text{CH}_2$ ), 27.9 ( $\text{CH}_2$ ), 33.5 ( $\text{CH}_2$ ), 40.3 (2 $\text{CH}_2$ ), 42.4 ( $\text{CH}_2$ ), 50.1 ( $\text{CH}_2$ ), 51.6 (CH), 52.8 (CH), 54.3 (CH), 66.2 (CH), 68.1 (d,  $J_{\text{C,F}} = 7.0$  Hz, CH), 70.6 (d,  $J_{\text{C,F}} = 17.0$  Hz, CH), 71.0 (CH), 72.6 ( $\text{CH}_2$ ), 81.9 (d,  $J_{\text{C,F}} = 168.0$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 98.1 (CH-anomer), 125.0 (CH-triazole), 140.2 (C-triazole), 156.7 (C=N), 170.2 (C=O), 170.7 (2C=O), 172.5 (C=O), 176.2 (C=O);  $^{19}\text{F}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 235 MHz)  $\delta$  -235.0 (td,  $J = 47.0$  Hz,  $J = 28.0$  Hz); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{FN}_{10}\text{O}_{12}\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  739.2845, found: 739.2883.

**4.8.14. Cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys)-S-[[1-[2-[(6-deoxy-6-fluoro- $\beta$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl] (49)**

HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{FN}_{11}\text{O}_{12}\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  868.3423, found: 868.3061,  $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$  445.6660, found: 445.6457.

**4.8.15. Cys-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>-S-[[1-[2-[(6-deoxy-6-fluoro- $\beta$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl] (50)**

MS  $m/z$  (Maldi) calcd for  $\text{C}_{57}\text{H}_{86}\text{FN}_{17}\text{O}_{15}\text{S}_2\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1354.5812, found: 1354.6.

**4.8.16. Cys-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>-S-[[1-[2-[(6-deoxy-6-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)oxy]ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl] (51)**

MS  $m/z$  (Maldi) calcd for  $\text{C}_{57}\text{H}_{86}\text{FN}_{17}\text{O}_{15}\text{S}_2\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1354.5812, found: 1354.7.

**4.8.17. Bis-(Arg-Gly-Asp-Cys-S)-6-(6-deoxy- $\alpha$ -D-trehalose)-bis-[[1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl] (53)**

Yield: 65%; white solid;  $R_f$  0.18 (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  80:20);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  1.60–1.77 (m, 4H), 1.85–2.00 (m, 4H), 2.63 (dd, 2H,  $J = 16.0$  Hz,  $J = 8.0$  Hz), 2.76 (dd, 2H,  $J = 16.0$  Hz,  $J = 5.0$  Hz), 2.88 (dd, 2H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 7.5$  Hz), 2.99 (dd, 2H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 4.5$  Hz), 3.22 (app t, 4H,  $J = 7.0$  Hz), 3.26 (t, 2H,  $J = 9.0$  Hz), 3.51 (dd, 2H,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 3.5$  Hz), 3.77 (app t, 2H,  $J = 9.0$  Hz), 3.88 (s, 4H), 3.98 (d, 2H,  $J = 17.0$  Hz), 4.00–4.08 (m, 4H), 4.15 (d, 2H,  $J = 17.0$  Hz), 4.39 (dd, 2H,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 4.5$  Hz), 4.53–4.63 (m, 2H), 4.57 (d, 2H,  $J = 4.0$  Hz), 4.69 (dd, 2H,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 4.5$  Hz), 4.75–4.84 (m, 2H), 7.98 (s, 2H, H-triazole);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100.6 MHz)  $\delta$  23.6 (2 $\text{CH}_2$ ), 25.3 (2 $\text{CH}_2$ ), 28.7 (2 $\text{CH}_2$ ), 33.3 (2 $\text{CH}_2$ ), 38.3 (2 $\text{CH}_2$ ), 40.4 (2 $\text{CH}_2$ ), 42.4 (2 $\text{CH}_2$ ), 50.8 (2 $\text{CH}_2$ ), 51.6 (2CH), 53.1 (2CH), 54.4 (2CH), 70.4 (2CH), 70.6 (2CH), 70.9 (2CH), 72.6 (2CH), 93.1 (2CH-anomer), 125.2 (2CH-triazole), 145.0 (2C-triazole), 156.7 (2C=N), 170.9 (2C=O), 172.6 (2C=O), 176.3 (2C=O), 178.0 (2C=O); HRMS  $m/z$  (ESI) calcd for  $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{N}_{20}\text{O}_{23}\text{S}_2$   $[(\text{M}/2)+2\text{H}]^{2+}$  684.2568, found: 684.2567.

**4.9. Platelet aggregation assay**

Venous blood was withdrawn from healthy volunteers who had not taken anti-platelet or non-steroidal anti-inflammatory drugs during the previous 10 days. Blood was collected in S-Monovette® tubes containing 0.106 M Trisodium citrate solution (Sarstedt). Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation of whole blood at 190g for 10 min at 20 °C. The remaining blood was again centrifuged at 1750g for 10 min at 20 °C to obtain platelet-poor

plasma (PPP). PRP was adjusted to  $300 \times 10^9$  platelets/L by addition of autologous PPP.

Platelet reactivity was measured by light transmission aggregometry (SD Innovation Aggregometer, Frouard, France). A 300  $\mu$ L aliquot of PRP was preincubated with glycopeptides or reference RGD, RGDC, c(RGDFV) or c(RGDFc) peptides (Bachem, Bubendorf, Switzerland) at various concentrations for 10 min at 37 °C. The mixture was then stirred at 1100 rpm and stimulated by 2.5  $\mu$ M ADP. Inhibition of platelet aggregation was measured at the maximal aggregation response estimated quantitatively by measuring the maximum curve height above baseline.

IC<sub>50</sub> values were determined from concentration–response curves fitted with a hyperbolic equation.

#### Acknowledgments

We thank the European Commission for a fellowship to CV (Project N°516.984), région Lorraine and Grand Nancy for a fellowship to C.C. and B. Fernette and F. Dupire for recording NMR and mass spectra, respectively. This work was partly supported by the 'Agence Nationale pour la Recherche' [ANR-13-BSV1-0026-01].

#### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.09.056>.

#### References and notes

- (a) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357; (b) Davis, B. G. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579; (c) Nicotra, F.; Cipolla, L.; Peri, F.; Ferla, B. L.; Redaelli, C. In *Chemoselective Neoglycosylation; Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Academic Press: New York, 2007; Vol. 61.; pp 353–398; (d) Specker, D.; Wittmann, V. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *267*, 65.
- Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H. *Science* **1994**, *266*, 776.
- (a) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287*, 2007; (b) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141; (c) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939; (d) He, Y.; Hinklin, R. J.; Chang, J.; Kiessling, L. L. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4479; (e) Liu, L.; Hong, Z.; Wong, C. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 429; (f) Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2010**, *16*, 191.
- (a) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, B. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596; (b) Tornøe, C. W.; Christensen, S.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057; (c) Kushwaha, D.; Tiwari, V. K. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8184; for a review see: (d) Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952; (e) Ahmad, F.; Abdullah, A. H.; Azmi, F.; Skwarczynski, M.; Toth, I. *Molecules* **2013**, *18*, 13148.
- (a) Dedola, S.; Nepogodiev, S. A.; Field, R. A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1006; (b) Wilkinson, B. L.; Bornaghi, L. F.; Houston, T. A.; Poulsen, S.-A. *Drug Des. Res. Perspect.* **2007**, *57*; (c) Santoyo-Gonzalez, F.; Hernandez-Mateo, F. *Top. Heterocycl. Chem.* **2007**, *7*, 133; (d) Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4207; (e) *Click Chemistry in Glycoscience. New Developments and Strategies*; Witczak, Z. J.; Bielski, R., Eds.; Wiley, 2013; pp 1–357.
- For the use of click cycloaddition between carbohydrate and amino-acids see: (a) dos Anjos, J. V.; Sinou, D.; de Melo, S. J.; Srivastava, R. M. *Synthesis* **2007**, 2647; (b) Hotha, S.; Kashyap, S. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 852; (c) Groothuys, S.; Kuijpers, B. H. M.; Quaedflieg, P. J. L. M.; Roelen, H. C. P. F.; Wiertz, R. W.; Blaauw, R. H.; van Delft, F. L.; Rutjes, F. P. J. T. *Synthesis* **2006**, 3146; (d) Arosio, D.; Bertoli, M.; Manzoni, L.; Scolastico, C. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3697; (e) Wan, Q.; Chen, J.; Chen, G.; Danishefsky, S. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8244; (f) Dondoni, A.; Giovannini, P. P.; Massi, A. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2929; (g) Lin, H.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13998; (h) Kuijpers, B. H. M.; Groothuys, S.; Keereweer, A. B. R.; Quaedflieg, P. J. L. M.; Blaauw, R. H.; van Delft, F. L.; Rutjes, F. P. J. T. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3123.
- For references on glyconjugate constructions using click cycloaddition see: (a) Kushwaha, D.; Dwivedi, P.; Kuanar, S. K.; Tiwari, V. K. *Curr. Org. Synth.* **2013**, *10*, 90; (b) Tiwari, V. K.; Kumar, A.; Schmidt, R. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *15*, 2945–2956; (c) Beckmann, H. S. G.; Wittmann, V. *Azides in Carbohydrate Chemistry. In Organic Azides*; Brase, S., Banert, K., Eds.; Wiley, 2010; pp 469–490; (d) Hemantha, H. P.; Lamani, R. S.; Sureshbabu, V. V. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2010**, *16*, 267; (e) Zhang, X.; Yang, X.; Zhang, S. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 830; (f) Haddleton, D. M.; Geng, J.; Mantovani, G.; Lindqvist, J. *Polym. Prepr.* **2008**, *49*, 602; (g) Yoon, S.; Hwang, S. H.; Ko, W. B. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8*, 3136; (h) Chabre, Y. M.; Contino-Pepin, C.; Placide, V.; Shiao, T. C.; Roy, R. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5602; (i) Ziegler, T.; Hermann, C. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2166; (j) Vecchi, A.; Melai, B.; Marra, A.; Chiappe, C.; Dondoni, A. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6437; (k) Marra, A.; Vecchi, A.; Chiappe, C.; Melai, B.; Dondoni, A. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2458; (l) Dondoni, A.; Marra, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7546; (m) Perez-Balderas, F.; Ortega-Munoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernandez-Mateo, F.; Calvo-Flores, F. G.; Calvo-Asin, J. A.; Isac-Garcia, J.; Santoyo-Gonzalez, F. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1951; (n) Fazio, F.; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9083; (o) Fazio, F.; Bryan, M. C.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397.
- Chapleur, Y.; Vala, C.; Chrétien, F.; Lamandé-Langle, S. *Toward Imaging Glycotools by Click Coupling. In Click Chemistry in Glycoscience. New Developments and Strategies*; Witczak, Z. J.; Bielski, R., Eds.; Wiley, 2013; pp 183–210.
- (a) Brueckner, K.; Zitterbart, R.; Seitz, O.; Beck, S.; Linscheid, M. W. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1069; (b) Stenzel, M. H. *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 14; (c) Hall, D. J.; Van den Bergh, H. M.; Dove, A. P. *Polym. Int.* **2011**, *60*, 1149.
- (a) du Vigneaud, V.; Loring, H. S.; Craft, H. A. *J. Biol. Chem.* **1934**, *105*, 481; (b) Marrone, L.; Siemann, S.; Beecroft, M.; Viswanatha, T. *Bioorg. Chem.* **1996**, *24*, 401; (c) Struthers, H.; Spingler, B.; Mindt, T. L.; Schibli, R. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6173; (d) Kalai, T.; Hubbell, W. L.; Hideg, K. *Synthesis* **2009**, 1336; (e) Bernardes, G. J. L.; Chalker, J. M.; Errey, J. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052.
- Lo Conte, M.; Pacifico, S.; Chambery, A.; Marra, A.; Dondoni, A. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4644.
- (a) Kurra, Y.; Odoi, K. A.; Lee, Y.-J.; Yang, Y.; Lu, T.; Wheeler, S. E.; Torres-Kolbus, J.; Deiters, A.; Liu, W. R. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1730; (b) Wang, S.; Yang, X.; Zhu, W.; Zou, L.; Zhang, K.; Chen, Y.; Xi, F. *Polymer* **2014**, *55*, 4812; (c) Zhang, X.; Zhang, Y. *Molecules* **2013**, *18*, 7145.
- Vala, C.; Chrétien, F.; Balentova, E.; Lamandé-Langle, S.; Chapleur, Y. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 17–20.
- Mackie, D. M.; Maradufu, A.; Perlin, A. S. *Carbohydr. Res.* **1986**, *150*, 23.
- Lindhorst, T. K.; Kotter, S.; Krallmann-Wenzel, U.; Ehlers, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 823.
- Park, S.; Shin, I. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1675.
- Pathak, A. K. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 683.
- (a) Li, Z.; Conti, P. S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 1031; (b) Kuhnast, B.; Dollé, F. *Curr. Radiopharm.* **2010**, *3*, 174; (c) Wängler, C.; Schirmacher, R.; Bartenstein, P.; Wängler, B. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1092; (d) Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1501.
- Paterson, S. M.; Clark, J.; Stubbs, K. A.; Chirila, T. V.; Baker, M. V. *J. Polym. Sci., Polym. Chem.* **2011**, *49*, 4312.
- (a) Ruoslahti, E. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697; (b) Danhier, F.; Le Breton, A.; Preat, V. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2961; (c) Wang, F.; Li, Y.; Shen, Y.; Klug, A.; Wang, S.; Xie, T. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 13447; (d) Siemion, I. Z.; Kuczyk, A.; Ceburat, M. *RGD Peptides. In Handbook of Biologically Active Peptides*, 2nd ed.; Kastin, A., Ed.; Elsevier, 2013; pp 705–713.
- (a) Owen, R. M.; Carlson, C. B.; Xu, J.; Mowery, P.; Fasella, E.; Kiessling, L. L. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 68; (b) Schottelius, M.; Laufer, B.; Kessler, H.; Wester, H.-J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 969; (c) Kuijpers, B. H. M.; Groothuys, S.; Soede, A. C.; Laverman, P.; Boerman, O. C.; Van Delft, F. L.; Rutjes, F. P. J. T. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1847; (d) Haubner, R.; Kuhnast, B.; Mang, C.; Weber, W. A.; Kessler, H.; Wester, H.-J.; Schwaiger, M. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 61; For a review see (e) Haubner, R.; Wester, H. J. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1439; (f) Gaertner, F. C.; Kessler, H.; Wester, H. J.; Schwaiger, M.; Beer, A. J. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*, 126.
- (a) Yu, Z.; Ananias, H. J. K.; Carlucci, G.; Hoving, H. D.; Helfrich, W.; Dierckx, R. A. J. O.; Wang, F.; de Jong, I. J.; Elsinga, P. H. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 3329; (b) Sancho, V.; Di Florio, A.; Moody, T. W.; Jensen, R. T. *Curr. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 79; (c) Lehmann, F. S.; Beglinger, C. *Gast Releasing Peptides. In Handbook of Biologically Active Peptides*, Kastin, A., Ed.; Elsevier, 2006; pp 1047–1055; (d) Liu, Y.; Hu, X.; Liu, H.; Bu, L.; Ma, X.; Cheng, K.; Li, J.; Tian, M.; Zhang, H.; Cheng, Z. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 2132; (e) Smith, C. J.; Volkert, W. A.; Hoffman, T. J. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 733; (f) Reubi, J. C. *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 389.
- Srinivasachari, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8176–8184.
- (a) Anderson, L. R.; Owens, T. W.; Naylor, M. J. *Biophys. Rev.* **2014**, *6*, 203; (b) Plow, E. F.; Meller, J.; Byzova, T. V. *Curr. Opin. Hematol.* **2014**, *21*, 241; (c) Goswami, S. *Adv. Biol. Chem.* **2013**, *3*, 224.
- (a) Kauskot, A.; Hoylaerts, M. F. Platelet Receptors. *In Handbook of Experimental Pharmacology: Antiplatelet Agents*; Greslele, P., Born, G. V. R., Patrono, C., Page, C. P., Eds.; Springer, 2012; pp 23–58; (b) Deckmyn, H.; De-Meyer, S. F.; Broos, K.; Vanhoorelbeke, K. Inhibitors of the Interactions between Collagen and its Receptors on Platelets. *In Handbook of Experimental Pharmacology: Antiplatelet Agents*; Greslele, P., Born, G. V. R., Patrono, C., Page, C. P., Eds.; Springer, 2012; pp 311–337; (c) Broos, K.; De-Meyer, S. F.; Fays, C.; Vanhoorelbeke, K.; Deckmyn, H. *Thromb. Res.* **2012**, *129*, 245; (d) Nuytens, B. P.; Thijs, T.; Deckmyn, H.; Broos, K. *Thromb. Res.* **2011**, *127*, S26; (e) Tao, L.; Zhang, Y.; Xi, X.; Kieffer, N. *Protein Cell* **2010**, *1*, 627; (f) Salsmann, A.; Schaffner-Reckinger, E.; Kieffer, N. *Eur. J. Cell. Biol.* **2006**, *85*, 249.

b) Effet des peptides RGD sur l'adhérence de CMLVs à la vitronectine et la génération de thrombine à la surface des CMLV (données non publiées)

b.1 Effet des peptides RGD sur l'adhérence de CMLVs de rat à la vitronectine

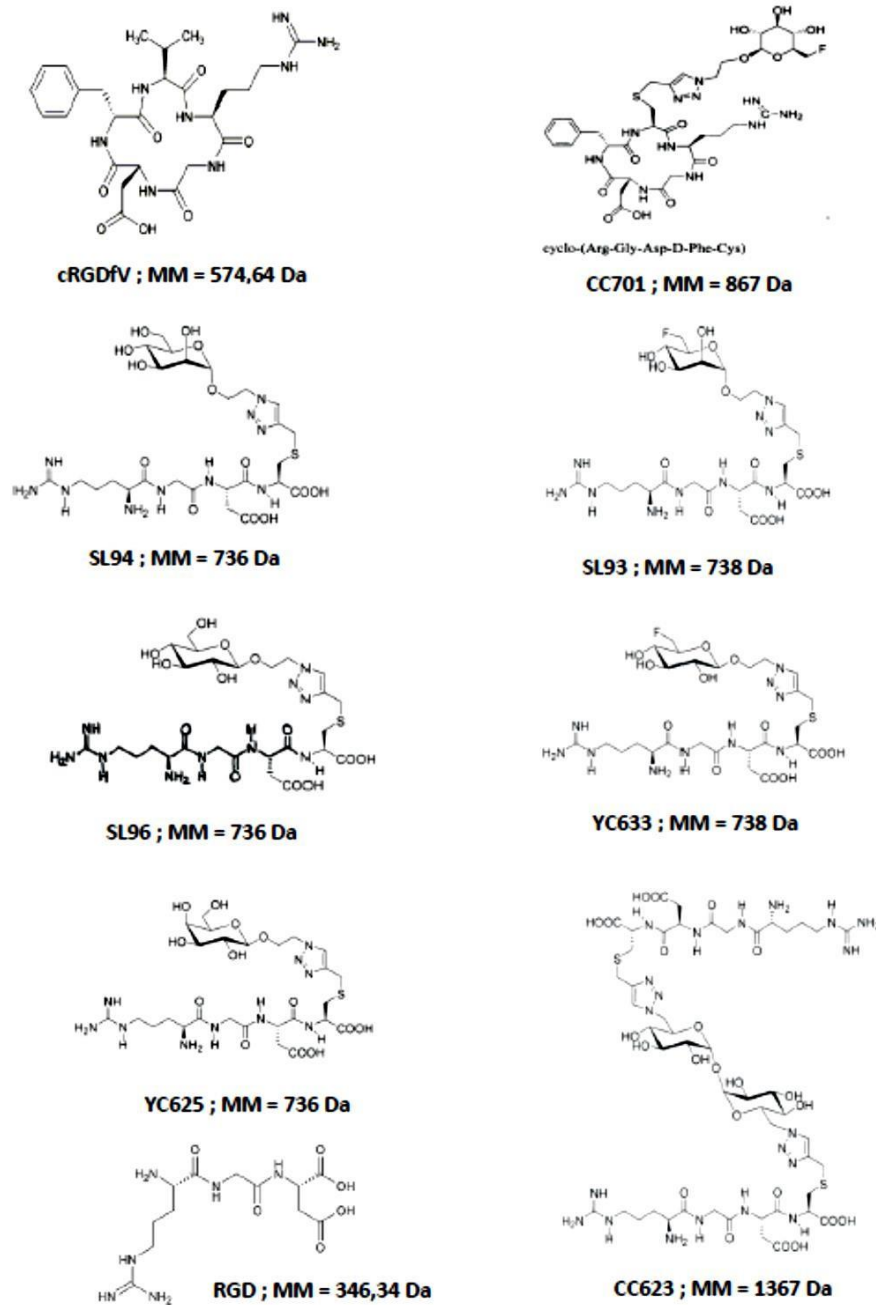


Figure 29 : Séquence et structure des glyco-peptides étudiés (MM : masse moléculaire)

*Inhibition de l'adhérence de CMLVs à la vitronectine par les peptides de référence cRGDfv et RGD*

## Chapitre 2 : Rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des CMLVs sur le phénotype de la coagulation et Caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux

### Glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux : Article 3 et résultats complémentaires

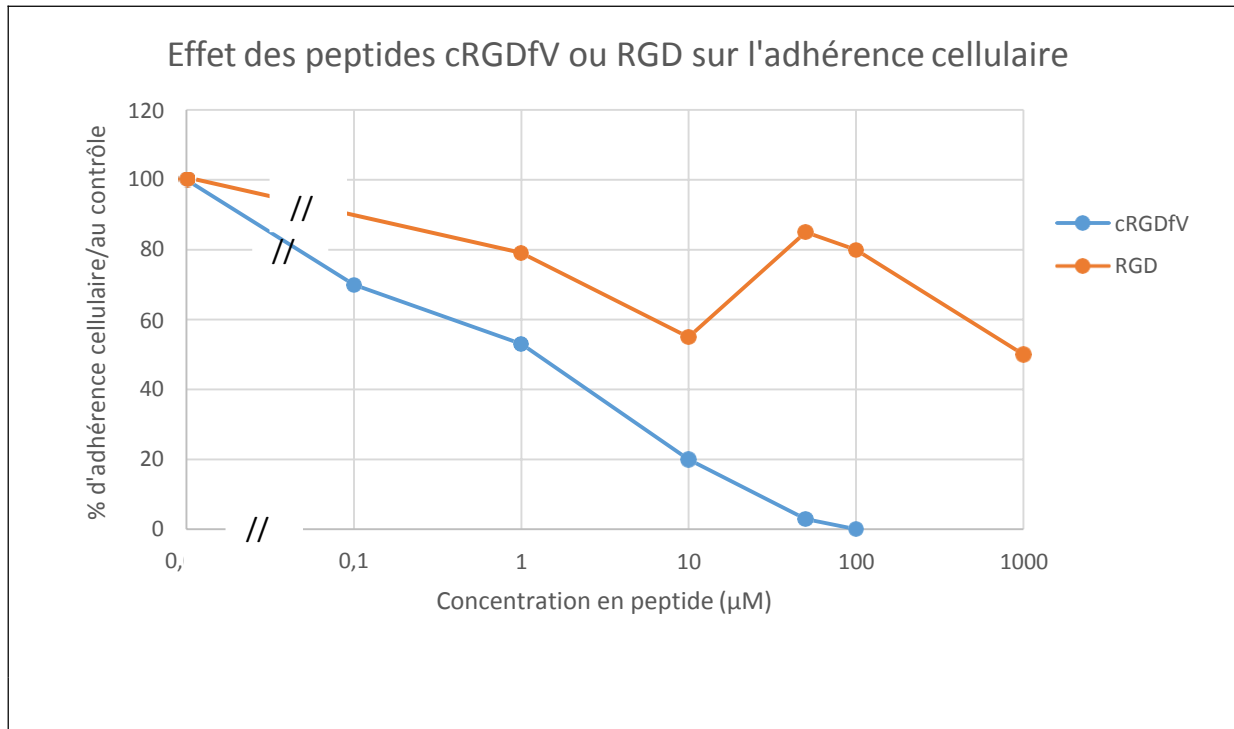
---

L'adhérence des cellules à un ligand (ici la vitronectine à 0,5  $\mu\text{g}/\text{puits}$ ) a été évaluée par coloration au bleu de toluidine qui marque les structures cellulaires acides comme l'ADN et l'ARN dans le noyau et le cytoplasme des cellules vivantes. Ce test a été mis au point à partir de la méthode décrite par (Stawowy et al., 2004) en 2004.. Nous avons vérifié la linéarité entre l'intensité de la coloration au bleu de toluidine et le nombre de CMLVs issues d'aorte thoracique de rats ayant adhéré aux surfaces de culture ( $r = 0,9999$ ,  $p = 0,0077$ ). Ensuite, la quantité optimale de cellules à utiliser a été évaluée à  $3 \times 10^4$  cellules par puits de plaque 96 puits.

#### *Inhibition de l'adhérence des CMLVs par les peptides cRGDfV et RGD*

L'effet inhibiteur de 0,1, 1, 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$  de peptide cRGDfV et 1, 10, 100 et 1000  $\mu\text{M}$  de RGD a été testé sur l'adhérence des CMLVs à la vitronectine. Les résultats sont montrés dans la **Figure 30**.

L'effet inhibiteur des peptides est dépendant de leur concentration. Dans le cas du peptide cRGDfV, une inhibition de 50% est obtenu pour une concentration d'environ 1  $\mu\text{M}$ . L'inhibition de l'adhérence des CMLVs est quasiment totale à 50  $\mu\text{M}$ . En revanche, une concentration de 1 mM de peptide RGD est nécessaire pour provoquer environ 50% d'inhibition, cette concentration (1 mM) est 1000 fois plus élevée que celle du peptide cRGDfV.



**Figure 30 : Inhibition de l'adhérence des CMLVs de rat à la vitronectine par les peptides de référence cRGDfv et RGD.** Les CMLVs ont été déposées à raison de  $3 \times 10^4$  cellules par puits. Le niveau d'adhérence est révélé par coloration avec du bleu de toluidine. Les résultats obtenus avec le peptide cRGDfv représentent la moyenne de 2 expériences en triplicate. Les résultats avec le peptide RGD sont obtenus à partir d'une expérience réalisée en triplicate. Le pourcentage d'adhérence est calculé par le rapport entre l'absorbance en présence de peptide et l'absorbance en absence de peptide.

*Effet des glycopeptides YC625, SL93 et CC701 sur l'adhérence des CMLVs à la vitronectine*

D'après nos résultats d'inhibition de l'agrégation plaquettaire, nous avons choisi les peptides YC625, SL93 et CC701 pour le test puisque le peptide YC625 présente la meilleure affinité parmi les peptides non fluorés, et le peptide SL93 a l'affinité la plus importante parmi les 3 peptides fluorés. D'autre part le peptide CC701 est le seul glycopeptide sous forme cyclique. Les résultats des trois peptides choisis sur le test d'adhérence sont présentés dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7:** Inhibition par les glycopeptides CC701, YC625 et SL93 et les peptides de référence cRGDfV et RGD de l'adhérence de CMLVs de rat à la vitronectine.

Peptide	IC <sub>50</sub> (μM)
cRGDfV	0,8
RGD	> 100
CC701	5,0
YC625	2,0
SL93	3,6

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> pour chaque peptide sont déterminées à partir des courbes traçant le % d'inhibition en fonction de la concentration de peptide.

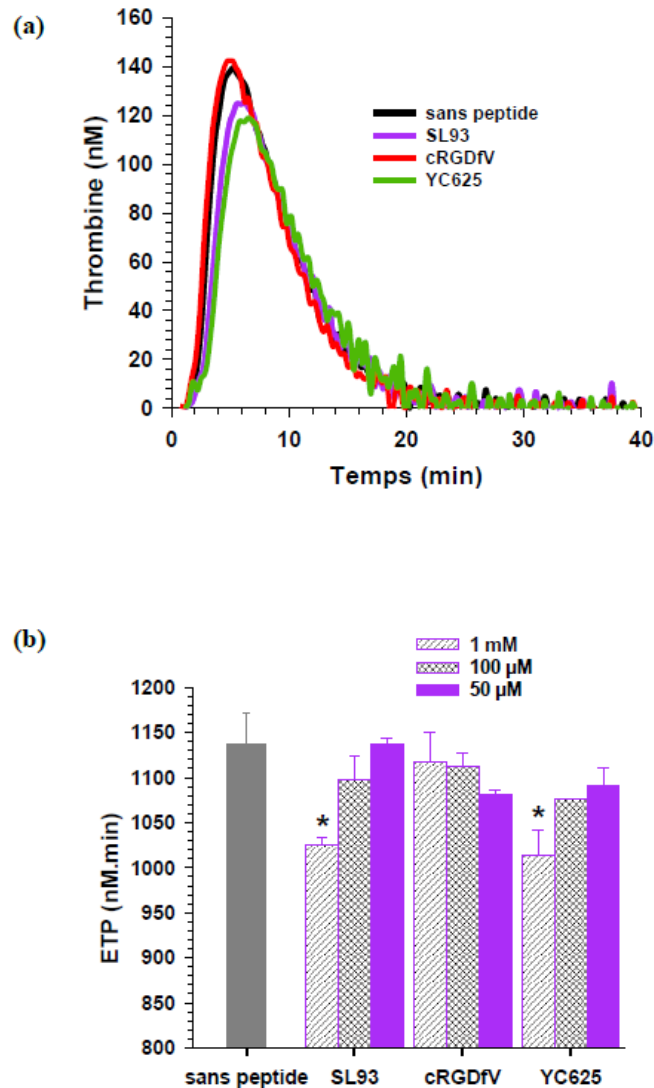
Comme observé dans les expériences d'agrégation plaquettaire, les peptides linéaires SL93 et YC625 altèrent fortement l'adhérence de CMLVs à la vitronectine (environ 90% d'inhibition) à 50 μM. Ces peptides sont donc beaucoup plus efficaces que le peptide RGD. A 10 μM, les 3 peptides étudiés inhibent plus de 50% de l'adhérence des CMVLs. L'effet inhibiteur de ces peptides est classé dans l'ordre croissant suivant : cRGDfV > YC625 et SL93 > CC701 > RGD.

### **b.2 Effet des peptides RGD sur la génération de thrombine à la surface de CMLVs de rat**

L'effet inhibiteur des peptides SL93 et YC625 sur la génération de thrombine à la surface de CMLVs adhérentes de rat a été comparé à celui du peptide cRGDfV.

Les CMLs de rat sontensemencées dans des plaques de culture 96 puits (MICROTEST™96) à raison de 7500 cellules/puits. Deux jours après, les cellules sont incubées avec les peptides pendant 15 min à 37°C en présence de CaCl<sub>2</sub> 1 mM avant addition de 80 μl d'un pool de PDP humain de donneurs sains et mesure de la génération de thrombine.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 31**.



**Figure 31 : Inhibition de la génération de thrombine à la surface de CMLVs de rat.** Les CMLVs adhérentes ont été incubées avec les différentes concentrations en peptide pendant 15 min à 37°C en présence de  $\text{CaCl}_2$  1 mM. Après lavage, le plasma est ajouté et la coagulation est déclenchée par addition de calcium 16,7 mM. Panel a : thrombinogramme typique après incubation des CMLVs avec les peptides à 1 mM. Panel b : valeurs moyennes  $\pm$  SEM (n = 3) du potentiel endogène de thrombine (ETP)

Le thrombinogramme n'est pas modifié par une pré-incubation des cellules avec le peptide cRGDFv alors que les courbes sont décalées vers la droite avec un pic de thrombine moins élevé par les peptides SL93 et YC625 à une concentration de 1 mM, ce qui se traduit par des valeurs d'ETP significativement plus faibles.

### 3) Discussion et conclusion

Les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_{IIb}\beta_3$  sont reconnues par leurs ligands (vitronectine, fibrinogène, ...) par une séquence RGD (Arg-Gly-Asp) qui est un médiateur important des interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire.

L'effet inhibiteur de peptides contenant une séquence RGD sur l'agrégation plaquettaire et l'adhérence cellulaire avait déjà été démontrée (Tomiya et al., 1992). La spécificité et l'affinité de ces peptides inhibiteurs pour les différentes intégrines dépend de leur structure et de leur conformation. Nous avons évalué l'effet de nouveaux glycopeptides contenant un motif RGD et un groupement glucidique marqué ou non au  $^{18}\text{F}$  sur des fonctions cellulaires dépendantes des intégrines  $\beta_3$ .

Nous avons utilisé, comme peptide de référence le peptide cRGDfV car celui-ci inhibe presque 100% de l'adhérence des cellules à la vitronectine (Verrier et al., 2002). Plusieurs travaux ont déjà décrit une plus grande inhibition de l'adhérence par un peptide cyclique que par un peptide linéaire (Verrier et al., 2002).

L'activité biologique de ces glycoRGD nouvellement synthétisés a été évaluée *in vitro* en agrégation plaquettaire. L'agrégation plaquettaire est une méthode couramment utilisée pour étudier les effets de peptides contenant une séquence RGD car le processus d'agrégation des plaquettes dépend de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Nous avons montré que l'addition d'un groupe prosthétique sucre potentialise l'effet inhibiteur des peptides RGD. De plus, l'ajout d'un atome de fluor à des glycopeptides ayant une séquence RGD ne modifie pas leurs propriétés inhibitrices sur l'agrégation plaquettaire.

Il est connu que les peptides cycliques sont plus affins que les peptides linéaires (en agrégation, le peptide cyclique cRGDfV a un effet inhibiteur plus important que le peptide linéaire RGD). Notre étude a montré que l'effet de la plupart des glycopeptides linéaires est plus important que celui des peptides cycliques. Ainsi, le caractère cyclique ne confère pas systématiquement une affinité plus grande mais la structure, et en particulier les groupements adjacents au motif RGD et/ou la structure imposée par la présence d'un groupe glucidique, joue également un rôle important. De plus, la présence d'un atome de fluor modifie très peu ces effets. Par contre, le glycopeptide cyclique exerce un effet plus faible d'inhibition de l'agrégation plaquettaire que le glycopeptide linéaire mais plus important qu'un peptide non glucidique cyclique.



## Chapitre 2 : Rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des CMLVs sur le phénotype de la coagulation et Caractérisation de glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux

### Glycopeptides pour l'imagerie des vaisseaux : Discussion et conclusion

---

Les peptides fluorés ou non ayant l'impact le plus fort sur l'agrégation plaquettaire (YC625 et SL93) d'après les valeurs d' $IC_{50}$  ont été comparés dans un test de génération de thrombine à la surface des CMLVs de rat en culture au peptide cRGDfV. Les résultats obtenus montrent une diminution de la génération de thrombine par les peptides SL93 et YC625.

Alors que nous avons montré que les glyco-RGD avaient un effet plus important que le peptide de référence cRGDfV en agrégation plaquettaire, nous avons observé une tendance inverse dans le test d'adhérence cellulaire. Les résultats peuvent être expliqués par une différence d'expression des intégrines à la surface des plaquettes et des CMLVs. A la surface des plaquettes, il existe de nombreuses molécules d'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  qui sont reconnues par leurs ligands contenant un motif RGD. A la surface des CMLVs, ce sont les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_1$  qui sont responsables de l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire. L'effet inhibiteur des glyco-RGD dans ces deux tests pose la question de la spécificité de liaison des peptides qui serait plutôt en faveur d'une spécificité pour la sous-unité  $\beta_3$ .

Le peptide RGD greffé sur un groupement glucidique et marqué au  $^{18}F$  a été testé en imagerie TEP chez une souris porteuse d'une tumeur. Il a été montré une plus forte absorption par les reins et la vessie et une plus faible absorption dans le sang. Ces résultats sont prometteurs pour la suite dans des tests évaluant ces nouveaux glycopeptides.

En conclusion, l'addition d'un groupe prosthétique sucre sur un motif RGD permet d'obtenir des peptides ayant une affinité du même ordre de grandeur qu'un peptide de référence cRGDfV pour les intégrines  $\beta_3$ . Déterminer la biodistribution, la pharmacocinétique et la toxicité des peptides sont les prochaines étapes envisagées. Par la suite, il sera intéressant de valider la spécificité et l'utilité de ce type de glycopeptides chez la souris normale et la souris invalidée de façon conditionnelle pour l'intégrine  $\alpha_v$  dans les CMLVs par imagerie TEP.

**Chapitre 3**

**Variants dans le locus 9p21, anomalies  
plaquettaires et de la génération de  
thrombine**

---

### I. Introduction et rationnel de l'étude

#### 1) Contexte de l'étude

Depuis les dix dernières années, de nombreuses découvertes tendent à accentuer l'importance de la composante génétique dans la plupart des maladies et facteurs de risque cardiovasculaires. L'année 2007 a vu l'émergence d'une importante découverte dans le domaine des ARN non-codants et leur implication dans les maladies cardiovasculaires (Helgadottir *et al.*, 2007 ; McPhearson *et al.*, 2007). Un des premiers tournants dans la compréhension du lien mécanistique entre composante génétique et pathologie cardiovasculaire a été d'identifier un locus génomique (locus de susceptibilité) associé à une augmentation de ces pathologies. Chez l'homme, le chromosome 9p21.3 est porteur de ce locus. En effet, ce locus est associée, entre-autres, aux phénotypes vasculaires pathologiques comme les anévrismes de l'aorte abdominale, les anévrismes cérébraux, l'artériopathie périphérique, l'athérome carotidien, les calcifications coronaires ou l'infarctus du myocarde. L'association du locus 9p21.3 à la maladie coronaire n'est pas expliquée par les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels tels que les lipides sanguins ou la pression artérielle. L'influence du génotype à ce locus sur le risque de maladie coronaire est d'autant plus importante que la maladie coronaire est sévère et précoce. Ses effets sont modulés par les facteurs d'environnement et d'hygiène de vie. Ces observations ont été rapportées dans différentes études de cohortes. En effet, McPhearson et ses collègues ont identifiés deux variants génétiques spécifiques (rs10757274 et rs2383206) dans la région 9p21.3 comme étant associées à la pathologie cardiovasculaire. La vaste majorité des variants génétiques sont des *single nucleotide polymorphisms* (SNP), à savoir des modifications d'une seule paire de bases d'ADN. Malgré de très nombreuses études réalisées depuis lors, nous ne savons toujours pas précisément pourquoi ce locus est associé à la maladie coronarienne. En dépit de son intérêt conceptuel majeur, il convient de rappeler que le locus 9p21.3 n'est qu'un des 32 loci associés à la maladie coronaire dans les études d'association (GWAS pour *Genome Wide Association Study*) à l'échelle du génome réalisées à ce jour.

#### 2) Pathophysiologie des maladies liées au locus 9p21

##### a) Pathophysiologie

La région 9p21 (séquence polymorphique de 58 kb) contient les gènes *CDKN2A* et *CDKN2B* situés à 100 kb en amont et qui codent pour des régulateurs du cycle cellulaire, à savoir p16INK4a, p14ARF et p15INb (Mottlerle *et al.*, 2012). Ces régulateurs sont des inhibiteurs des kinases cyclines-dépendantes

(CDK) (Loinard et al., 2014). Le locus 9p21 contient également le gène *ANRIL* pour « *Antisens Noncoding RNA in the INK4 Locus* » qui code pour un ARN non-codant susceptible de réguler l'expression de différents gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et la sénescence, en particulier, les gènes *PRC1* et *PRC2* qui codent pour des protéines connues pour leur effet sur la prolifération cellulaire. Ces régulations interviennent dans la prolifération des CMLVs qui sont des acteurs majeurs dans la formation des plaques d'athérome. Expérimentalement, il a été montré que ces mutations au niveau du chromosome 9p21 induisent une diminution de l'expression des régulateurs p16INK4a, p15INb et ANRIL ainsi qu'une augmentation de la prolifération des CMLVs en culture (Motterle et al., 2012). Les variants 9p21 altèrent l'activité du gène ANRIL, ce qui réduit de ce fait la production de ces protéines ce qui favorise la croissance et la prolifération des cellules, notamment de celles qui interviennent dans la formation de la plaque artérielle et l'athérosclérose (McPherson, 2009).

#### **b) Modèle murin de la délétion du locus 9p21**

Avec l'objectif de mettre au point un modèle animal pour développer des études mécanistiques fonctionnelles Visel *et al.* (Visel et al., 2010) ont délété, en 2010, une région de 70 kb du chromosome 4 de la souris correspondant à la région de risque 9p21. Il a observé une diminution de l'expression de *Cdkn2a* et *Cdkn2b* chez la souris mutante ainsi qu'un doublement de la capacité proliférative des CMLVs aortiques en culture.

Chez la souris ayant une délétion de ce locus, il y a également une diminution de la voie de signalisation Smad2 qui est dépendante du TGF- $\beta$  ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de Smad2 qui est dépendante des CDKs (*Cdkn2a* et *Cdkn2b*), ce qui aboutit à une baisse de l'activité anti-proliférative de Smad (Loinard et al., 2014).

Par la suite, l'équipe du Pr. Ziad Mallat a établi un lien direct entre la délétion de cette région de 70 kb et la susceptibilité à développer un anévrisme chez la souris après administration d'angiotensine-II (AT-II) et d'anti-TGF- $\beta$  durant 28 jours (Loinard *et al.*, 2014 ; Wang et al., 2016). Une collaboration établie avec le Pr. Ziad Mallat à Cambridge (Royaume-Uni) nous a permis d'obtenir deux couples de souris hétérozygotes pour cette délétion à partir desquels nous avons généré des souris mutées et contrôles. Toutes les expériences ont été réalisées avec des souris âgées de trois à six mois et conformément au « Guide pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire » et approuvés par le Comité d'éthique animal de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

### 3) Objectifs de l'étude

Notre objectif était de déterminer si le déficit des transcrits codés par ce locus ou des mutations ponctuels (SNP) prédisposent à un phénotype pro-thrombotique et à une rigidité artérielle. Notre approche a combiné une étude chez la souris avec une délétion de la région de 70 kb dans le chromosome 4 (Chr4<sup>Δ70kb</sup>) et une étude chez l'homme dans des populations de sujets âgés.

Nos objectifs se déclinaient en plusieurs points :

- Dans un premier temps, afin d'évaluer le potentiel thrombotique *in vivo* des souris, nous avons étudié (i) la formation d'un thrombus après lésion artérielle au FeCl<sub>3</sub> et (ii) la formation du thrombus dans un modèle de thrombose physiologique à la queue chez les souris homozygotes mutées et contrôles.
- Dans un deuxième temps, pour déterminer si la délétion avait un impact sur la thrombine formée dans le compartiment sanguin et dans la paroi, nous avons mesuré la génération de thrombine *in vitro* (i) dans le sang total, les plasmas riches ou pauvres en plaquettes et (ii) à la surface des CMLVs des souris mutées et contrôles. Nous avons complété cette étude avec un dosage des différents facteurs impliqués dans la cascade de coagulation.
- En parallèle, nous avons étudié l'influence des plaquettes dans le phénotype observé en mesurant la réactivité plaquettaire.
- Enfin, la fréquence allélique de 7 variants situés dans le locus 9p21 et leur association avec une génération de thrombine plasmatique ou une rigidité artérielle augmentée a été déterminée dans deux populations de sujets âgés, la première composée de femmes ménopausées sans pathologie cardiovasculaire déclarée, la seconde constituée de patients (hommes et femmes) hypertendus avec plaintes mnésiques.

## II. Article 4 : Résultats principaux 9p21 (non publiés)

### 1) Résultats

#### - Chez la souris :

Afin de caractériser l'effet de la délétion du locus 9p21 sur la thrombose *in vivo*, nous avons étudié dans un premier modèle, le temps de saignement à la queue (**Figure 32A**). Les résultats montrent que celui-ci est significativement plus court chez les souris avec une délétion de la région de 70 kb dans le chromosome 4 (Chr4<sup>Δ70kb</sup>) appelées souris KO que celui obtenu chez les souris contrôles, appelées WT. Ce résultat est étayé par l'observation que 20 % des souris WT ont un temps d'arrêt du saignement supérieur à 1800 s alors que l'arrêt du saignement survient avant 1800 s pour toutes les souris KO. D'autre part, le nombre de saignements transitoires avant d'atteindre l'arrêt définitif du saignement est également significativement diminué chez les souris KO en comparaison avec les souris WT. De manière logique, nous avons observé une diminution significative du volume sanguin perdu par les souris KO par rapport aux souris WT.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons étudié la formation du thrombus dans le modèle de thrombose après lésion artérielle au FeCl<sub>3</sub> que nous avons utilisé dans nos études chez le rat SHR et la souris invalidée pour la sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines dans les CMLVs (**Figure 32B**). De manière générale, la diminution de la vélocité du sang traduit une occlusion progressive de l'artère jusqu'à une occlusion totale montrée par une vélocité nulle (**Figure 32B** de gauche). La vélocité du sang avant l'application sur la carotide du buvard imbibé de FeCl<sub>3</sub> est identique chez les souris WT et KO. A partir de la vélocité, le temps d'occlusion est déterminé et montre que le temps d'occlusion pour les souris KO est diminué par rapport à celui observé pour les souris WT. En effet, 6 souris KO sur 7 présentent une occlusion totale de l'artère avant 30 min alors que 5 souris WT sur 7 ne montrent pas d'occlusion totale à 30 min (**Figure 32B**, panel central). Ceci se traduit par une diminution plus rapide du % de souris présentant une carotide fonctionnelle chez les souris KO par rapport aux souris WT (**Figure 32B**, panel de droite).

Enfin, l'étude de la formation du thrombus physiologique *in vivo* (**Figure 32C**) montre une quantité significativement plus importante de fibrine et de CD41 (marqueur des plaquettes) dans le thrombus des carotides des souris KO par rapport aux souris WT, 300 s et 1200 s après la section de la queue indépendamment du compte plaquettaire qui n'est pas modifié ( $403 \pm 22$  (n = 24) pour les souris KO versus  $392 \pm 23$  (n = 22) pour le souris WT, p = 0,73).

L'ensemble de ces résultats montre que la délétion Chr4<sup>Δ70kb</sup> accélère la thrombose et que ce phénotype est probablement causé par une plus grande formation de fibrine et une participation plus importante des plaquettes, ce qui suggère une augmentation de la génération de thrombine exerçant à la fois des effets coagulants (formation de fibrine) et des effets cellulaires (activation des plaquettes).

Ainsi, pour vérifier cette hypothèse, la fonction plaquettaire (**Figure 33**) a été étudiée. Dans un premier temps, nous avons mesuré l'expression des glycoprotéines membranaires (**Figure 33A**). La délétion Chr4<sup>Δ70kb</sup> chez la souris ne provoque aucune modification de l'expression des glycoprotéines quantifiées. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'agrégation plaquettaire qui n'est pas modifiée en réponse à la plupart des agonistes testés sauf en réponse à la thrombine (**Figure 33B**). En effet, le pourcentage d'agrégation maximal en réponse à la thrombine est augmenté de 14% chez les souris KO par rapport aux souris WT. L'augmentation de l'agrégation plaquettaire ne semble pas liée à une augmentation de l'activation plaquettaire et de la sécrétion des granules  $\alpha$  puisque l'expression de la P-sélectine par les plaquettes (**Figure 33C**) est équivalente dans les deux génotypes.

L'expression du récepteur PAR-1 détectée par cytométrie en flux est augmentée sur les plaquettes des souris KO par rapport aux plaquettes des souris WT (intensité moyenne de fluorescence =  $34 \pm 5$  pour les souris KO versus  $18 \pm 6$  pour les souris WT). Cette augmentation représente un mécanisme pour expliquer des effets cellulaires accrus de la thrombine chez la souris KO. Par ailleurs, une modification du flip flop membranaire (**Figure 33D**) en réponse à une stimulation par la thrombine, traduisant une plus grande surface de phospholipides anioniques disponible pour la coagulation, pourrait contribuer à l'augmentation de génération de thrombine. En effet, la quantité d'annexine V liée aux plaquettes augmente fortement chez les souris KO par rapport aux souris WT, même à la plus faible concentration étudiée de thrombine. En revanche, ni l'expression de la P-sélectine ni la liaison de l'annexine V ne sont modifiées en présence de collagène, même à la plus forte concentration.

Enfin, la microvésiculation (quantité de microparticules générées, **Figure 33E**) augmente progressivement en réponse à des concentrations croissantes de thrombine. Les microparticules, qui apportent des surfaces catalytiques nécessaires à l'activation des facteurs de coagulation, pourraient contribuer à augmenter également la génération de thrombine. La microvésiculation est généralement décrite comme l'étape ultime d'activation des plaquettes. De manière surprenante, alors que ni l'agrégation plaquettaire, ni la sécrétion de granule  $\alpha$  et ni le flip-flop n'étaient augmentés en réponse au collagène, le pourcentage de microparticules générées à partir des plaquettes est fortement augmenté (37,5%) chez les souris KO par rapport aux souris WT. Ce résultat suggère que la

microvésiculation, considérée comme un événement tardif secondaire à l'agrégation plaquettaire, peut survenir indépendamment de l'agrégation plaquettaire.

Afin d'expliquer le phénotype prothrombotique de la souris KO, nous avons cherché à évaluer l'impact de la délétion Chr4<sup>Δ70kb</sup> sur la génération de thrombine formée dans le compartiment sanguin et la paroi artérielle (**Figure 34**). Tout d'abord, la génération de thrombine dans le compartiment sanguin est significativement augmentée en sang total chez la souris KO par rapport à la souris WT (**Figure 34B**). Pour connaître la participation des plaquettes dans cet état prothrombotique, la génération de thrombine a été mesurée en PRP et en PPP (**Figure 34B**). Celle-ci est augmentée dans les deux spécimens plasmatiques chez les souris KO par rapport aux souris WT. Il est donc peu probable que la contribution des plaquettes soit majeure dans le phénotype hyper-coagulable de la souris KO.

Les résultats de nos études sur le rat SHR et la souris invalidée pour la sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines dans les CMLVs ont montré une contribution majeure des CMLVs dans la formation d'un thrombus carotidien après application de FeCl<sub>3</sub>. De plus dans le modèle de la souris  $\alpha_v^{SMKO}$ , nous avons suggéré une participation de la paroi artérielle à la génération de thrombine dans le compartiment sanguin. Afin de déterminer si la paroi artérielle pourrait participer à l'augmentation de la génération de thrombine observée chez les souris KO en sang total, en PRP et en PPP et/ou à la formation de thrombus artériel, nous avons étudié la génération de thrombine à la surface des CMLVs mises en culture à partir d'aortes de souris WT ou KO. Les CMLVs ont été incubées avec du PPP de souris WT ou du PPP de souris KO (**Figure 34C**). Nous n'avons observé aucun effet du génotype des souris sur la génération de thrombine à la surface des CMLVs. Cette absence de modification de génération de thrombine à la surface des CMLVs de souris KO est à corrélérer avec une absence de modification de pression artérielle et des propriétés mécaniques de la paroi, connues pour influencer la génération de thrombine (Mao *et al*, 2012, Ait Aissa *et al.*, 2015). Les pressions artérielles moyenne, diastolique, systolique et la pression pulsée restent comparables dans les 2 génotypes. D'autre part, les propriétés mécaniques de l'artère des souris KO restent inchangées à l'âge étudié puisque la distensibilité et la relation contrainte/déformation ne sont pas significativement modifiées par la délétion Chr4<sup>Δ70kb</sup> (**Figure 34D**). Ces résultats suggèrent que la surface cellulaire de la CMLV n'est pas un déterminant majeur de l'état prothrombotique de la souris KO. Ils soulèvent également la question de la contribution des facteurs de coagulation plasmatiques.



Nous avons dosé les principaux facteurs déterminants de la génération de thrombine et nous avons mis en évidence une diminution significative de la concentration en antithrombine et une augmentation de la concentration en TM soluble chez la souris KO (**Tableau 8**).

En conclusion, nous avons mis en évidence pour la première fois que la délétion Chr4<sup>Δ70kb</sup> chez la souris entraîne un phénotype hypercoagulable se traduisant par une augmentation de la formation du thrombus dans des modèles de thrombose physiologique et chimique. Ce phénotype pourrait être engendré par une augmentation de la génération de thrombine dans le sang et de la réactivité plaquettaire en réponse à une stimulation par la thrombine sans modification des propriétés mécaniques de la paroi artérielle. Au niveau moléculaire, comme pour la souris invalidée pour la sous-unité  $\alpha v$  des intégrines dans les CMLVs, nous pouvons émettre l'hypothèse que la TM synthétisée par la paroi et secrétée dans le compartiment sanguin contribue au phénotype procoagulant. De plus, l'association de la délétion Chr4<sup>Δ70kb</sup> avec une diminution de la concentration en antithrombine suggère une régulation génique ou épigénétique complexe puisque le gène codant pour l'antithrombine n'est pas situé sur le chromosome 9 chez l'homme ni sur le chromosome 4 chez les souris.

**Tableau 8:** Dosage des facteurs de coagulation dans le plasma des souris WT et KO.

	WT n = 8-10	KO n = 8-10	P
Fibrinogène (g/L)	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2	0,39
Prothrombine (%)	65 ± 6	66 ± 4	0,97
Facteur VIII (%)	125 ± 16	135 ± 19	0,70
Facteur tissulaire (U/mL)	3,9 ± 0,8	4,0 ± 0,7	0,98
Antithrombine (%)	100 ± 5	81 ± 8	0,03
TFPI (U/mL)	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2	0,82
VWF (%)	106 ± 25	107 ± 16	0,98
Thrombomoduline (ng/mL)	7,4 ± 0,7	12,3 ± 1,6	0,02

Les résultats sont exprimés en moyenne ± ESM.

2) Figures et légendes de l'article 4 (9p21)

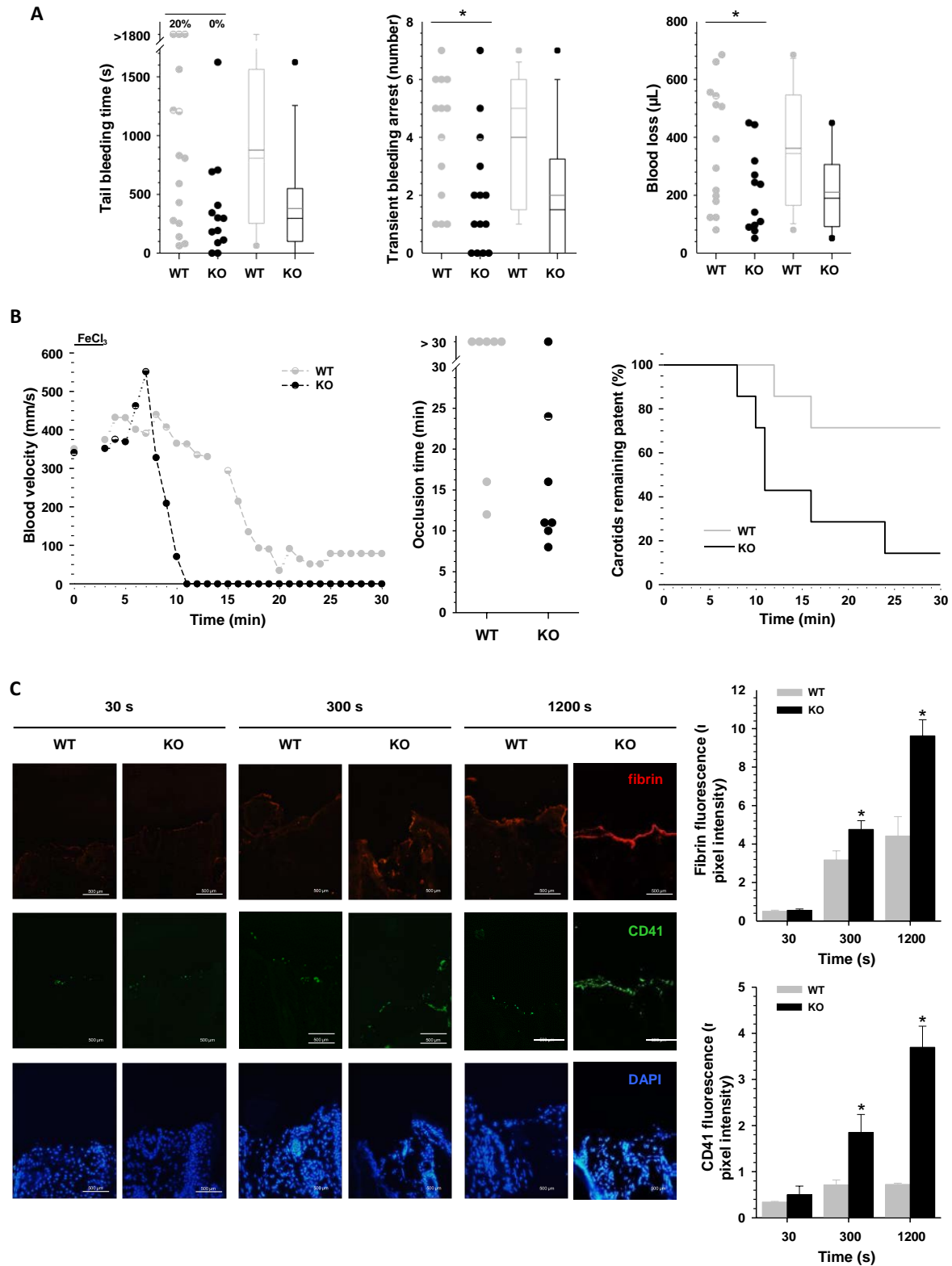


Figure 32 : Modèles de saignement et de thrombose chez les souris sauvages et avec délétion Chr4<sup>Δ70kb</sup>

**(A)** Dans un modèle de saignement à la queue, plusieurs paramètres ont pu être évalués chez 15 souris sauvages (WT) et 14 souris avec délétion Chr4<sup>Δ70kb</sup> (KO) à l'âge de 5 mois : Le temps de saignement à la queue (en s) est représenté à gauche, le nombre d'arrêts transitoires du saignement (au milieu) et le volume de sang perdu (en  $\mu\text{L}$ ) pour chaque souris (à droite). Pour chaque graphe, un point représente la valeur pour une souris et les boîtes à moustaches représentent les médianes, 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentiles ainsi que les barres d'erreur (10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles). La moyenne apparaît avec un trait horizontal de couleur différente de la boîte à moustache. Le chiffre « 20% » indique que pour 20 % des souris, il n'y a pas eu d'arrêt de saignement au bout de 1800 s et « 0% » que l'arrêt du saignement est survenu avant 1800 s.

**(B)** Un modèle de thrombose artérielle au niveau carotidien, induite par du chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ), a été réalisé chez 7 souris sauvages et 7 souris KO. La vélocité du sang dans la carotide est mesurée pendant 30 min grâce à une sonde de 30 MHz, sur l'appareil d'Echo-Doppler. Un enregistrement typique pour une souris WT et une souris KO est montré dans le panel de gauche. Le temps d'occlusion total a pu être déterminé lorsqu'il était inférieur ou égal à 30 min (panel au centre), chaque point représente la valeur d'une souris. Enfin, le pourcentage d'animaux présentant une carotide fonctionnelle (plus de 5 % de flux restant par rapport au flux basal) au cours du temps a été déterminé sur 30 min dans chaque groupe (panel de droite).

**(C)** Le modèle de thrombus physiologique à la queue consiste à plonger l'extrémité de la queue de la souris sectionnée à 3 mm de la fin de la queue dans du sérum physiologique (NaCl à 0,9 %) chauffé à 37°C pendant 10 s, 30 sec, 5 min ou 20 min. La portion de queue où s'est formé le thrombus est prélevée et des sections longitudinales de queue sont réalisées et analysées par immunofluorescence chez 3 souris KO et 3 souris WT pour chaque temps. Les images typiques à 30 s, 300 s et 1200 s montrent la fibrine (en rouge), le CD41 (en vert) et les noyaux (en bleu) sur le panel de gauche pour les souris WT et KO. La quantification des immunofluorescences de la fibrine et du CD41 sont présentées sous formes d'histogrammes, à droite, comme la moyenne + ESM.

\*,  $p < 0,05$  souris KO versus souris WT

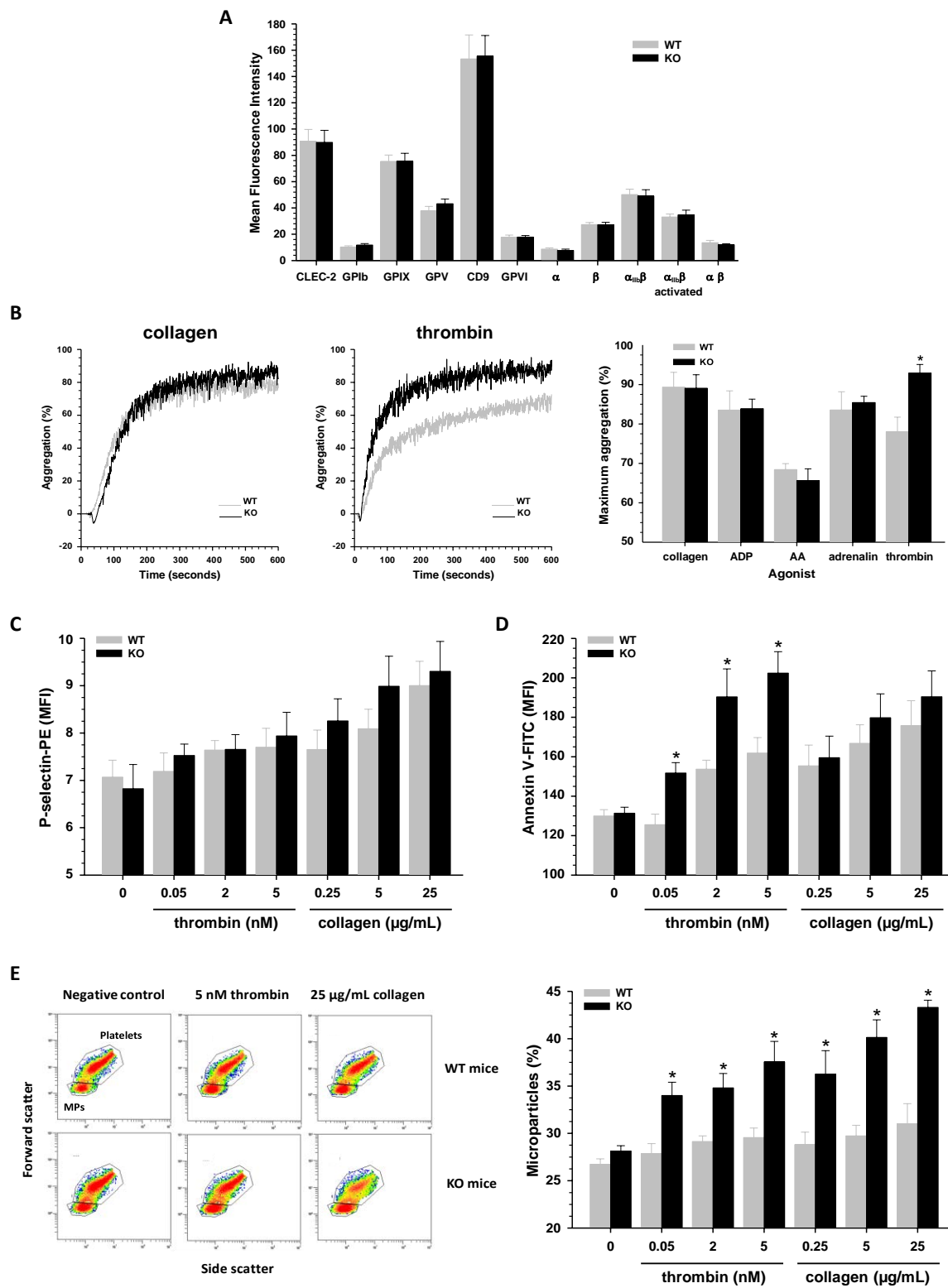


Figure 33 : Fonction plaquettaire des souris sauvages et avec délétion Chr4<sup>Δ70kb</sup>

**A)** L'expression des glycoprotéines de surface impliquées dans les différentes fonctions plaquettaires a été quantifiée par cytométrie en flux à la surface des plaquettes de 9 souris sauvages (WT, en gris) et de 9 souris avec délétion Chr4<sup>Δ70kb</sup> (KO, noir) âgées de 5 semaines. Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (Mean Fluorescence Intensity, MFI) ± ESM.

**B)** L'agrégation plaquettaire a été mesurée par turbidimétrie. Des courbes typiques du % d'agrégation en fonction du temps sont obtenues en présence de différents agonistes (2 µg/mL de collagène, 10 µM d'ADP, 0,1 mg/mL d'acide arachidonique (AA), 10 µM adrénaline ou 0,1 U/mL de thrombine). Deux exemples sont présentés pour le collagène et pour la thrombine. L'agrégation maximale moyenne (à droite), déclenchée par addition de ces différents agonistes est exprimée en % d'agrégation maximale ± ESM.

Un anticorps anti P-selectine couplé à la phycoerythrine (**C**) ainsi que de l'annexine V couplée à la FITC qui se lie à la phosphatidylsérine (**D**) ont été utilisés pour mesurer respectivement la sécrétion des granules α et le flip-flop membranaire des souris WT et KO par cytométrie en flux. Les expériences ont été réalisées en absence ou en présence de concentrations croissantes de thrombine (0,05 ; 2 et 5 nM) et de collagène (0,25 ; 5 ; 25 µg/mL). Les résultats sont exprimés comme la moyenne de la MFI ± ESM

(E) La microvésiculation plaquettaire a été étudiée chez les souris WT et KO en absence ou en présence de concentrations croissantes de thrombine (0,05 ; 2 et 5 nM) ou de collagène (0,25 ; 5 ; 25 µg/mL) par cytométrie en flux. Les microparticules issues des plaquettes sont sélectionnées par rapport à leur taille et sont dénombrées. Des cytogrammes représentatifs sont montrés à gauche en absence d'agoniste ou en présence de 5 nM de thrombine ou 25 µg/mL de collagène pour une souris WT et une souris KO. Le pourcentage de microparticules en fonction des différentes concentrations d'agonistes est présenté dans l'histogramme de droite.

Tous les histogrammes de la figure représentent les moyennes ± ESM. \*, p<0,05 KO versus WT. N = 10 par groupe.

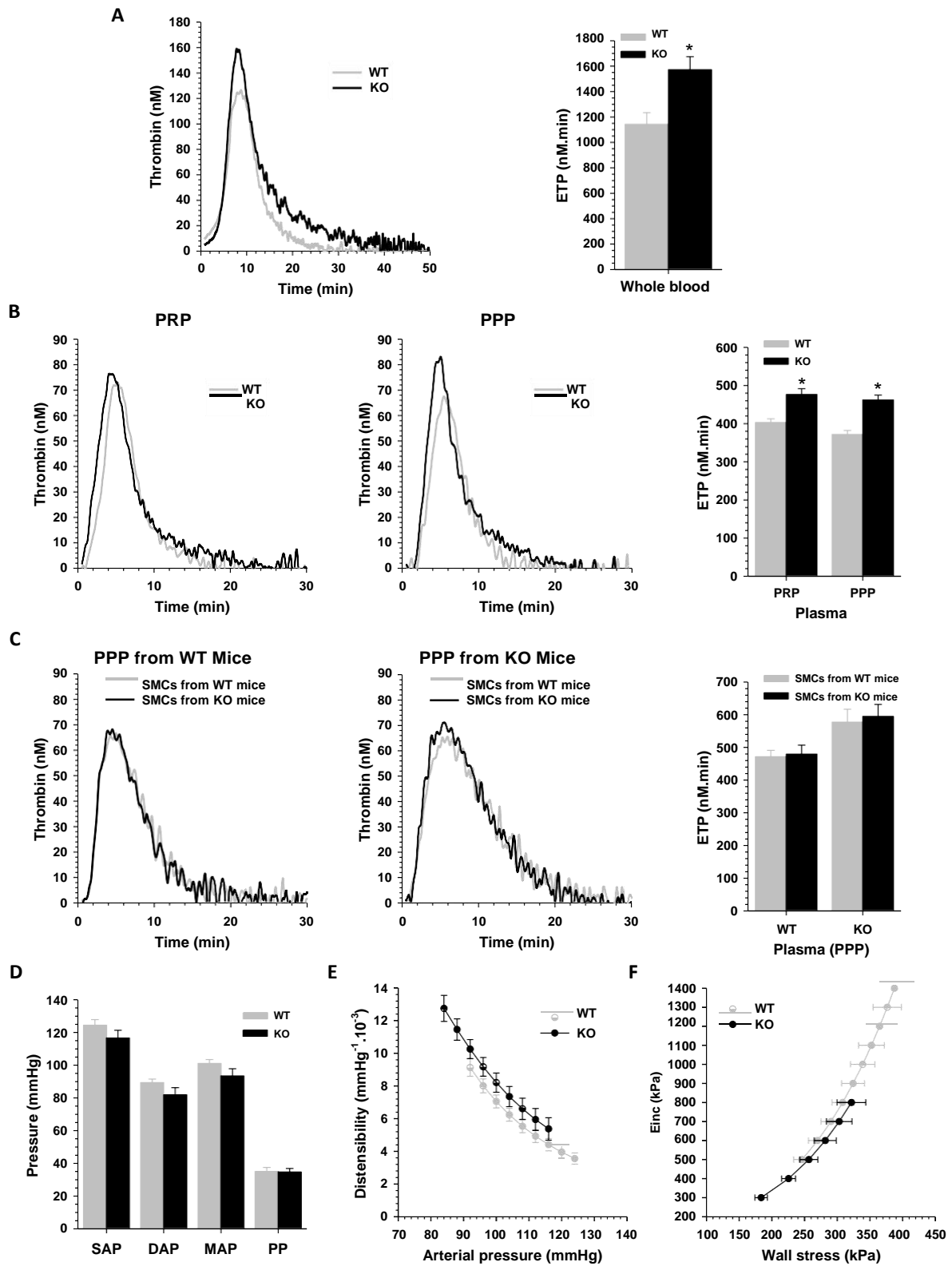


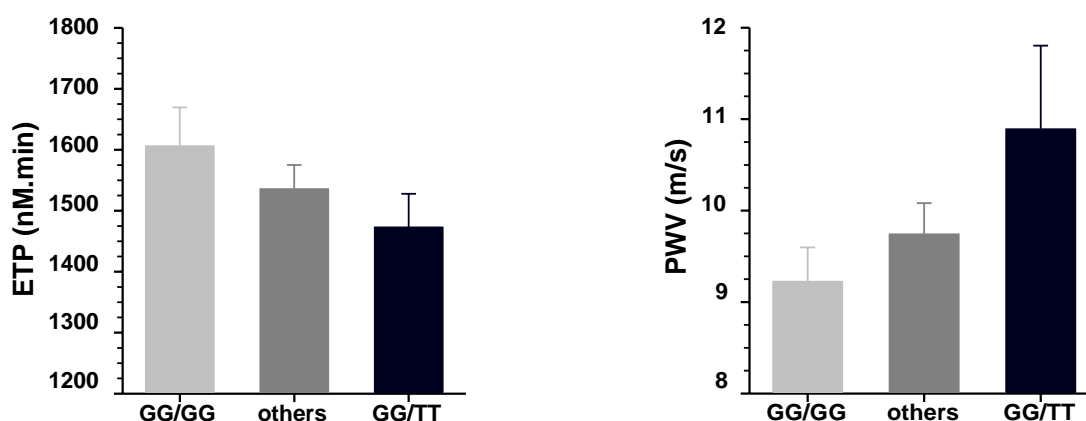
Figure 34 : Génération de thrombine plasmatique et tissulaire chez les souris sauvages et avec délétion Chr4 $\Delta$ 70kb

La génération de thrombine en fonction du temps a été mesurée chez les souris sauvages (WT, en gris) et les souris avec délétion Chr4<sup>Δ70kb</sup> (KO, noir) âgées de 5 semaines dans différentes conditions : en sang total (Whole blood) **(A)**, en plasma riche en plaque (PRP) ou en plasma pauvre en plaquette (PPP) **(B)** et à la surface de CMLVs mises en culture à partir d'aortes de souris WT et KO, en utilisant soit du PPP de souris WT soit du PPP de souris KO **(C)**. Pour chaque condition, des thrombinogrammes représentatifs d'une souris WT et d'une souris KO sont montrés à gauche alors que l'ETP moyen de chaque groupe (en nM.min) est présenté sous forme d'histogramme à droite. Les pressions artérielles systolique (SAP), diastolique (DAP), moyenne (MAP) ainsi que la pression pulsée (PP) sont présentées en **(D)** chez les souris WT et KO. La distensibilité (Distensibility) exprimée en mmHg<sup>-1</sup>.10<sup>-3</sup> en fonction de la pression artérielle (Arterial pressure) en mmHg est présentée en **(E)**. Enfin, par transformation mathématique de ces courbes, les relations entre le module élastique en fonction de la contrainte pariétale (Einc /wall stress) a été obtenue et montrée en **(F)**. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*, p<0,05 KO versus WT. n= 8 -10 par groupe.

- Chez l'homme

La fréquence allélique de 7 variants situés dans le locus 9p21 et leur association avec la génération de thrombine plasmatique ou la vitesse de l'onde de pouls (paramètre de mesure de la rigidité artérielle) a été déterminée dans deux populations de sujets âgés, la première composée de femmes ménopausées sans pathologie cardiovasculaire déclarée (population ARTEOS, la seconde constituée de patients (hommes et femmes) hypertendus avec plaintes mnésiques (population ADELAYDE).

Les premiers résultats (**Tableau 9**) montrent que les allèles mutés sont présents sous forme homozygote à des fréquences variant de 16 à 33 % dans ces deux populations. Ils mettent également en évidence des modifications des valeurs d'ETP et de vitesse de l'onde de pouls (VOP) avec certains variants (**Figure 35**). Ces résultats suggèrent des variations opposées de l'ETP et de la VOP pour les SNP étudiés.



**Figure 35 : Valeurs d'ETP et de vitesse de l'onde de pouls (PWV pour pulse wave velocity) en fonction de la présence d'allèles de risque du locus 9p21 dans la population ARTEOS.** Les sujets ont été classés en 3 groupes, les sujets double-homozygotes pour les allèles de risque des variants rs10120688 (GG) et rs1333049 (GG), les sujets double-homozygotes pour les allèles de risque des variants rs10757279 (GG) et rs1333040 (TT) et l'ensemble des sujets porteurs d'un autre génotype



**Tableau 9.** Distribution dans deux populations humaines des génotypes pour 7 variants situés dans le locus 9p21

Genotype	Population ARTEOS				Population ADELAYDE			
	Allèle de référence	Allèle de risque	Homozygote pour l'allèle de référence	Hétérozygote	Homozygote pour l'allèle de risque	Hétérozygote	Homozygote pour l'allèle de référence	Hétérozygote
rs1333040	C	T	22 (22)	45 (45)	33 (33)	22 (16.8)	66 (50.4)	43 (32.8)
rs1333049	C	G	17 (17)	50 (50)	33 (33)	32 (24.4)	71 (54.2)	28 (21.4)
rs10120688	A	G	33 (33)	43 (43)	24 (24)	38 (29.0)	63 (48.1)	30 (22.9)
rs7865618	A	G	43 (43)	41 (41)	16 (16)	45 (34.4)	62 (47.3)	24 (18.3)
rs10757279	A	G	32 (32)	49 (49)	19 (19)	26 (19.9)	73 (55.7)	32 (24.4)
rs1556516	C	G	26 (26)	47 (47)	27 (27)	41 (31.3)	66 (50.4)	24 (18.3)
rs1360590	C	T	33 (33)	39 (39)	28 (28)	36 (27.5)	65 (49.6)	30 (22.9)

Les résultats sont exprimés en nombre de sujets (%)

### III. Discussion et Conclusion

Depuis peu, de nombreuses études ont montré une relation évidente entre les variants génétiques et les maladies cardiovasculaires. Il a été établi une forte association entre les variants génétiques dans la région du chromosome 9p21 et la présence de maladies cardiovasculaires (McPhearson *et al.*, 2007). Néanmoins, les conséquences au niveau de l'expression des gènes, de l'épigénétique ou les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas encore connus. Peu d'études ont été réalisées sur les modifications de l'hémostase et de la thrombose dans le modèle de souris avec une délétion correspondant à ce locus.

Nous avons montré une accélération de la formation du thrombus artériel occlusif en réponse à une stimulation par du chlorure ferrique dans la carotide et une diminution du temps de saignement à la queue d'un facteur 2 chez les souris KO. Ainsi, nous avons montré, pour la première fois, un lien causal direct entre la délétion du locus de risque Chr4<sup>Δ70kb</sup> chez la souris correspondant au locus 9p21 chez l'homme et la prédisposition à la thrombose. Nos résultats sont confortés par un modèle original de thrombose physiologique au niveau de la queue qui montre un dépôt plus important de fibrine et de plaquettes à la surface de la lésion chez les souris KO. En effet, l'initiation du thrombus artériel se fait par l'interaction plaquette-plaquette qui implique des glycoprotéines membranaires (Denis and Wagner, 2007) et qui précède la formation d'un réseau de fibrine qui stabilise le caillot. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente qui a montré une corrélation entre la structure anormale de la fibrine et les maladies pro-thrombotiques (Undas et al., 2011) et une autre étude qui a montré que le risque thrombotique est associé à une augmentation du nombre de plaquettes (Rinder *et al.*, 1998). Dans notre modèle, le compte plaquettaire n'est pas modifié mais le nombre de plaquettes dans le réseau de fibrine augmente fortement pour la souris KO.

Nous avons également étudié l'effet de cette délétion sur la réactivité plaquettaire. Pour cela, nous avons mesuré l'agrégation des plaquettes lavées *in vitro* en réponse à trois agonistes (ADP, collagène et thrombine). Nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives d'agrégation des plaquettes lavées des souris *in vitro* en réponse à l'ADP et le collagène entre les souris WT et KO. Ces résultats divergent par rapport à l'étude de l'association de SNPs sur le chromosome 9p21.3 dans une cohorte d'adulte Amish qui a montré que les allèles associés aux pathologies cardiovasculaires sont également associés à une augmentation de l'agrégation plaquettaire en réponse au collagène (Musunuru et al., 2010). Ceci est peut-être lié à la forte concentration de collagène utilisée dans cette

étude qui induirait un relargage plus important du thromboxane et des granules qui sont présents en faible quantité voir absents à faible dose de collagène. Toutefois, les plaquettes des souris KO agrègent plus fortement que les plaquettes des souris WT en réponse à la thrombine. Cette différence peut être liée aux récepteurs à la thrombine présents à la surface des plaquettes, nos résultats mettant en évidence une plus grande quantité de récepteurs PAR-1 à la surface des plaquettes des souris KO. En effet, Wang *et al.*, ont montré que le récepteur à la thrombine PAR-4 à la surface des plaquettes chez des souris déficientes pour le transcript *Cdkn2a* augmente l'activation des plaquettes ce qui facilite les interactions plaquettes-leucocytes. Cette même équipe a montré que ces souris qui ont un plus grand compte plaquettaire, possède également une plus grande mégacaryopoïèse dans la moelle osseuse ce qui pourrait également expliquer le phénotype prothrombotique de nos souris (Wang et al., 2016).

L'expression de la phosphatidylsérine est significativement augmentée en réponse à la thrombine chez les souris KO comparativement aux souris WT. De même, la quantité de microparticules plaquettaires est significativement augmentée en réponse à la thrombine et au collagène chez les souris KO. Ces résultats sont la conséquence d'une plus forte réactivité plaquettaire. Effectivement, il est connu que l'activation procoagulante des plaquettes est due à l'exposition rapide de la phosphatidylsérine du feuillet cytoplasmique sur le feuillet exoplasmique membranaire (Ramstrom et al., 2003) et s'accompagne de l'émission de microparticules. Celles-ci sont présentes dans le sang des individus sains et sont augmentées dans plusieurs maladies dont les maladies cardiovasculaires (Phillip Owens III *et al.*, 2011). Elles pourraient expliquer en partie le phénotype prothrombotique observé dans notre modèle car elles fournissent des surfaces catalytiques pour la cascade de la coagulation.

Pour évaluer la réactivité du système de la coagulation *in vitro*, la technique de thrombinographie en sang total, en plasma riche en plaquettes (PRP), en plasma pauvre en plaquettes (PPP) a été utilisée. Les expériences réalisées en sang total, PPP et PRP chez ces souris mettent en évidence une plus forte génération de thrombine chez les souris KO que chez les souris WT. Les CMLVs sont capables de générer de la thrombine à leurs surfaces (Mao *et al.*, 2012). Alors que Visel et al., ont montré que les CMLVs en culture issues des souris déficientes pour l'intervalle de risque 9p21 prolifèrent deux fois plus vite (Visel et al., 2010), ce qui suggère un changement de phénotype des CMLVs, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de la génération de thrombine à la surface des CMLVs des souris KO. Ces résultats ne sont pas en faveur d'une contribution majeure de la paroi artérielle dans le phénotype prothrombotique des souris KO comme nous l'avons montrée dans nos autres modèles. Par contre,

ils orientent vers un mécanisme moléculaire plasmatique, soit une augmentation des facteurs procoagulants, soit une diminution des facteurs anticoagulants. Nos résultats pointent sur une modification de la concentration en antithrombine dont il est important dans le futur de rechercher l'origine, au niveau de la transcription, de la traduction ou de la dégradation.

Nos résultats chez l'homme suggèrent également que des variants dans le locus 9p21 sont susceptibles d'avoir un retentissement à la fois sur la coagulation et sur la rigidité artérielle. Les variations en sens opposé de ces deux phénotypes dans notre première analyse ne sont pas en faveur de notre hypothèse de liens entre la rigidité artérielle et l'hypercoagulabilité. Il convient toutefois d'envisager une analyse plus complexe car ces variants ne sont pas tous indépendants et doivent être étudiés en prenant en compte les déséquilibres de liaison. Si nos résultats suggèrent à la fois chez la souris et chez l'homme un phénotype procoagulant associé au locus 9p21, une véritable question est de savoir comment étudier les conséquences fonctionnelles d'un variant d'un SNP (chez l'homme) par rapport à une délétion d'un locus de 70 kb (chez la souris). Une approche de type protéomique ou microarray apporterait sans doute des éléments de réponse.

# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

---

Les facteurs de risques tels que l'hypertension, le syndrome métabolique ou encore l'athérosclérose sont à l'origine de la majorité des pathologies cardiovasculaires. Il est bien connu depuis de nombreuses années que les CMLVs qui composent la paroi artérielle jouent un rôle prépondérant dans l'athérosclérose. La prolifération, la migration et le changement phénotypique des CMLVs aggravent la formation de la plaque d'athérome (Bennett et al., 2016).

Ces maladies se caractérisent pour la plupart par une thrombophilie acquise, c'est-à-dire un état de prédisposition à la thrombose (Santilli et al., 2012).

L'ensemble de nos résultats montre un lien entre les modifications du compartiment vasculaire et celles du compartiment sanguin. Un résultat majeur est la mise en évidence du rôle des CMLVs dans le phénotype prothrombotique de la paroi artérielle dans nos différents modèles, résumé dans la revue en **Annexe** sur les « propriétés pro- et anti-coagulantes associées aux cellules musculaires lisses vasculaires ». Ce rôle procoagulant est non seulement causé par une externalisation des phospholipides anioniques à la face externe de la membrane plasmique mais aussi par l'expression de récepteurs pour les facteurs de la coagulation en particulier l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

De plus, nos travaux ont montré dans le SMet (dans le modèle du rat Zucker), une forte expression des MMPs par les CMLVs. Le changement phénotypique des CMLVs entraîne également une augmentation de la thrombine générée à la surface de ces cellules qui pourrait être en partie expliquée par la présence d'acides gras libres. Nous retrouvons ces caractéristiques dans un autre modèle pathologique qui est l'HTA (dans le modèle du rat SHR) et qui est une des composantes du SMet. En effet, nous avons montré que l'hypertension modifie le phénotype des CMLVs, ce qui se traduit comme dans le SMet par une plus forte quantité de thrombine générée à la surface des CMLVs.

Par ailleurs, nous avons montré dans ces deux modèles pathologiques que l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est fortement exprimée à la surface des CMLVs. Cette intégrine, en se liant à la thrombine, est responsable du remodelage vasculaire et de la thrombose.

Pour apporter des éléments de preuve directe du rôle de cette intégrine, nous avons montré que la délétion de la sous-unité d'intégrine  $\alpha_v$  à la surface des CMLVs (dans un modèle murin) diminue la génération de thrombine et la thrombose (Mottlerle et al., 2012).

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a la particularité de reconnaître la séquence RGD de ses ligands. Nous avons montré que de nouveaux glycopeptides contenant une séquence RGD diminuent l'agrégation plaquettaire, la génération de thrombine à la surface des CMLVs et leur adhérence à la vitronectine. Nous avons également montré que l'addition d'un groupement prothétique sucre sur un motif RGD et un

marquage au  $^{18}\text{F}$  permet d'obtenir des peptides ayant une affinité du même ordre de grandeur qu'un peptide de référence de type cRGDfV. Ces peptides représentent des outils de premier choix pour l'imagerie TEP chez la souris mais aussi pour l'imagerie de la paroi par microscopie à fluorescence. Leur utilisation *in vivo* pour bloquer les fonctions de l'intégrine demande encore quelques développements, notamment en termes de biodistribution, de pharmacocinétique et de ciblage des cellules d'intérêt. Ainsi, selon la concentration et le pouvoir inhibiteur de ces peptides, nous pourrions visualiser l'intégrine dans les vaisseaux (en tant que biomarqueur de la pathologie cardiovasculaire) en présence d'une concentration faible de peptides. A fortes concentrations, ils pourraient être utilisés pour inhiber les thromboses.

Une question reste néanmoins pour laquelle nous ne pouvons pas conclure sur la base de nos résultats. Nous n'avons pas clairement établi si les nouveaux glycopeptides sont spécifiques de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  ou s'ils reconnaissent exclusivement la sous-unité  $\beta_3$  car ce sont les intégrines  $\alpha_{IIb}\beta_3$  qui sont exprimées en grande quantité sur les plaquettes et qui sont impliquées dans l'agrégation plaquettaire. Leur effet sur la sous-unité  $\alpha_v$  reste à définir pour expliquer l'effet inhibiteur sur la génération de thrombine à la surface des CMLVs. De plus, il serait intéressant de préciser si cette intégrine doit être sous sa forme active ou non.

De nombreuses pathologies cardiovasculaires (HTA, anévrisme, Smet...) ont montré l'existence de composantes génétiques majeures dans le développement de ces syndromes délétères (Vallès *et al.*, 1994). En raison de la complexité et du nombre de facteurs de risque, un grand nombre de maladies multifactorielles font interagir des facteurs environnementaux et des facteurs de génétique. Nous avons montré que la délétion (dans un modèle de souris) d'un locus correspondant au locus de risque 9p21 chez l'homme associé aux maladies cardiovasculaires entraîne un phénotype prothrombotique avec une plus grande génération de thrombine.

Bien qu'une étude antérieure ait montré chez ces souris présentant une délétion de ce locus que les CMLVs en culture prolifèrent plus que les CMLVs des souris contrôles, jouant ainsi un rôle important dans le développement de l'athérosclérose (Visel *et al.*, 2010), nous n'avons pas montré de différence de thrombine générée à la surface des CMLVs en culture. La mutation semble entraîner une modification de la génération de thrombine du compartiment sanguin sans modification de la génération de thrombine tissulaire.

Nous avons montré dans des cohortes de patients âgés et/ou présentant des troubles neurodégénératifs une fréquence élevée des variants génétiques situés dans la région de risque 9p21. Chez l'homme, contrairement à notre modèle de souris, les mutations sont ponctuelles et ne

concernent pas la délétion d'un locus entier. Concernant les facteurs génétiques, de nombreux variants génétiques ont été identifiés pour une même maladie, qui entraînent chacun un risque relatif faible (Ardaillou and Le Gall, 2006). L'étude de ces variants génétiques présente un intérêt biologique car elle permet d'identifier des voies métaboliques et des interactions inconnues. Actuellement, les conséquences fonctionnelles de la présence de variants du locus 9p21 sur la coagulation et la rigidité artérielle restent à étudier sur un plan mécanistique.

Dans la perspective de développer de nouveaux agents capables de prévenir la thrombose ou l'hypertension tout en préservant l'hémostase, nos travaux ont permis de proposer la piste de la génération de thrombine tissulaire impliquant les CMLVs et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

Une alternative serait d'axer les études sur les interactions GPIb $\alpha$ -VWF impliquées dans la thrombose artérielle occlusive. La co-administration d'un inhibiteur spécifique de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et d'un inhibiteur de la liaison GPIb $\alpha$ -VWF, qui ciblerait ainsi la génération de thrombine à la surface des CMLVs, pourrait aussi conduire au développement de stratégies thérapeutiques plus efficaces.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

- Abouhamed, M., S. Reichenberg, H. Robenek, and G. Plenz. 2003. Tropomyosin 4 expression is enhanced in dedifferentiating smooth muscle cells in vitro and during atherogenesis. *Eur J Cell Biol.* 82:473-482.
- Abram, C.L., and C.A. Lowell. 2009. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol.* 27:339-362.
- Adams, M.A., A. Bobik, and P.I. Korner. 1989. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. *Hypertension.* 14:191-202.
- Aissa, K.A., J. Lagrange, A. Mohamadi, H. Louis, B. Houppert, P. Challande, D. Wahl, P. Lacolley, and V. Regnault. 2015. Vascular Smooth Muscle Cells Are Responsible for a Prothrombotic Phenotype of Spontaneously Hypertensive Rat Arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.*
- Ait Aissa, K., J. Lagrange, A. Mohamadi, H. Louis, B. Houppert, P. Challande, D. Wahl, P. Lacolley, and V. Regnault. 2015. Vascular smooth muscle cells are responsible for a prothrombotic phenotype of spontaneously hypertensive rat arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 35:930-937.
- Albinsson, S., and P. Hellstrand. 2007. Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293:C772-782.
- Alexander, M.R., M. Murgai, C.W. Moehle, and G.K. Owens. 2012. Interleukin-1beta modulates smooth muscle cell phenotype to a distinct inflammatory state relative to PDGF-DD via NF-kappaB-dependent mechanisms. *Physiol Genomics.* 44:417-429.
- Andre, P., S.M. Delaney, T. LaRocca, D. Vincent, F. DeGuzman, M. Jurek, B. Koller, D.R. Phillips, and P.B. Conley. 2003. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest.* 112:398-406.
- Andrews, R.K., J.A. Lopez, and M.C. Berndt. 1997. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 29:91-105.
- Arciniegas, E., A.B. Sutton, T.D. Allen, and A.M. Schor. 1992. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci.* 103 ( Pt 2):521-529.
- Ardaillou, R., and J.Y. Le Gall. 2006. [Generalized neonatal screening based on laboratory tests]. *Bull Acad Natl Med.* 190:1745-1759.
- Auge, N., F. Maupas-Schwalm, M. Elbaz, J.C. Thiers, A. Waysbort, S. Itohara, H.W. Krell, R. Salvayre, and A. Negre-Salvayre. 2004. Role for matrix metalloproteinase-2 in oxidized low-density lipoprotein-induced activation of the sphingomyelin/ceramide pathway and smooth muscle cell proliferation. *Circulation.* 110:571-578.
- Badimon, L., T. Padro, and G. Vilahur. 2012. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 1:60-74.
- Bagoly, Z., Z. Koncz, J. Harsfalvi, and L. Muszbek. 2012. Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb Res.* 129:382-387.
- Bajaj, M.S., S. Steer, M.N. Kuppaswamy, W. Kisiel, and S.P. Bajaj. 1999. Synthesis and expression of tissue factor pathway inhibitor by serum-stimulated fibroblasts, vascular smooth muscle cells and cardiac myocytes. *Thromb Haemost.* 82:1663-1672.
- Bar-Shavit, R., V. Sabbah, M.G. Lampugnani, P.C. Marchisio, J.W. Fenton, 2nd, I. Vlodavsky, and E. Dejana. 1991. An Arg-Gly-Asp sequence within thrombin promotes endothelial cell adhesion. *J Cell Biol.* 112:335-344.
- Bayoumi, R.A., S.A. Al-Yahyaee, S.A. Albarwani, S.G. Rizvi, S. Al-Hadabi, F.F. Al-Ubaidi, A.T. Al-Hinai, M.N. Al-Kindi, H.T. Adnan, H.S. Al-Barwany, A.G. Comuzzie, G. Cai, J.C. Lopez-Alvarenga, and M.O. Hassan. 2007. Heritability of determinants of the metabolic syndrome among healthy Arabs of the Oman family study. *Obesity (Silver Spring).* 15:551-556.
- Beeler, D., R. Rosenberg, and R. Jordan. 1979. Fractionation of low molecular weight heparin species and their interaction with antithrombin. *J Biol Chem.* 254:2902-2913.
- Beer, A.J., and M. Schwaiger. 2008. Imaging of integrin alphavbeta3 expression. *Cancer Metastasis Rev.* 27:631-644.

- Bennett, M.R., S. Sinha, and G.K. Owens. 2016. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res.* 118:692-702.
- Besser, M., C. Baglin, R. Luddington, A. van Hylckama Vlieg, and T. Baglin. 2008. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *J Thromb Haemost.* 6:1720-1725.
- Bevers, E.M., M. Galli, T. Barbui, P. Comfurius, and R.F. Zwaal. 1991. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost.* 66:629-632.
- Bezie, Y., J.M. Lamaziere, S. Laurent, P. Challande, R.S. Cunha, J. Bonnet, and P. Lacolley. 1998. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:1027-1034.
- Birukov, K.G., M.G. Frid, J.D. Rogers, V.P. Shirinsky, V.E. Koteliansky, J.H. Campbell, and G.R. Campbell. 1993. Synthesis and expression of smooth muscle phenotype markers in primary culture of rabbit aortic smooth muscle cells: influence of seeding density and media and relation to cell contractility. *Exp Cell Res.* 204:46-53.
- Blann, A.D., T. Naqvi, M. Waite, and C.N. McCollum. 1993. von Willebrand factor and endothelial damage in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 7:107-111.
- Blockmans, D., H. Deckmyn, and J. Vermynen. 1995. Platelet activation. *Blood Rev.* 9:143-156.
- Boehm, M., and E.G. Nabel. 2001. Cell cycle and cell migration: new pieces to the puzzle. *Circulation.* 103:2879-2881.
- Boneu, B., Cazenave, J.P. 1997. "Hémostase primaire" dans "Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose". *Reims : Boehringer Ingelheim*:5-32.
- Boos, C.J., G.Y. Lip, and A.D. Blann. 2006. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 48:1538-1547.
- Borissoff, J.I., H.M. Spronk, S. Heeneman, and H. ten Cate. 2009. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res.* 82:392-403.
- Bottcher, R.T., A. Lange, and R. Fassler. 2009. How ILK and kindlins cooperate to orchestrate integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 21:670-675.
- Bou-Gharios, G., M. Ponticos, V. Rajkumar, and D. Abraham. 2004. Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell Prolif.* 37:207-220.
- Bretschneider, E., R. Spanbroek, K. Lotzer, A.J. Habenicht, and K. Schror. 2003. Evidence for functionally active protease-activated receptor-3 (PAR-3) in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost.* 90:704-709.
- Bretschneider, E., B. Uzonyi, A.A. Weber, J.W. Fischer, R. Pape, K. Lotzer, and K. Schror. 2007. Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor. *Circ Res.* 100:255-262.
- Brooks, P.C., R.A. Clark, and D.A. Cheresh. 1994. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science.* 264:569-571.
- Broos, K., S.F. De Meyer, H.B. Feys, K. Vanhoorelbeke, and H. Deckmyn. 2012. Blood platelet biochemistry. *Thromb Res.* 129:245-249.
- Brown, S.L., C.H. Lundgren, T. Nordt, and S. Fujii. 1994. Stimulation of migration of human aortic smooth muscle cells by vitronectin: implications for atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 28:1815-1820.
- Brown, W.M., S.R. Beck, E.M. Lange, C.C. Davis, C.M. Kay, C.D. Langefeld, S.S. Rich, and S. Framingham Heart. 2003. Age-stratified heritability estimation in the Framingham Heart Study families. *BMC Genet.* 4 Suppl 1:S32.
- Bryckaert, M., J.P. Rosa, C.V. Denis, and P.J. Lenting. 2015. Of von Willebrand factor and platelets. *Cell Mol Life Sci.* 72:307-326.
- Butenas, S., and K.G. Mann. 2002. Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc).* 67:3-12.
- Byzova, T.V., and E.F. Plow. 1997. Networking in the hemostatic system. Integrin alphaIIb beta3 binds prothrombin and influences its activation. *J Biol Chem.* 272:27183-27188.

- Byzova, T.V., and E.F. Plow. 1998. Activation of alphaVbeta3 on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J Cell Biol.* 143:2081-2092.
- Calderwood, D.A. 2004. Integrin activation. *J Cell Sci.* 117:657-666.
- Campbell, R.A., K.A. Overmyer, C.H. Selzman, B.C. Sheridan, and A.S. Wolberg. 2009. Contributions of extravascular and intravascular cells to fibrin network formation, structure, and stability. *Blood.* 114:4886-4896.
- Cao, H., N. Dronadula, and G.N. Rao. 2006. Thrombin induces expression of FGF-2 via activation of PI3K-Akt-Fra-1 signaling axis leading to DNA synthesis and motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290:C172-182.
- Caplice, N.M., C.S. Mueske, L.S. Kleppe, T.E. Peterson, G.J. Broze, Jr., and R.D. Simari. 1998. Expression of tissue factor pathway inhibitor in vascular smooth muscle cells and its regulation by growth factors. *Circ Res.* 83:1264-1270.
- Carey, D.J. 1991. Control of growth and differentiation of vascular cells by extracellular matrix proteins. *Annu Rev Physiol.* 53:161-177.
- Carter, A.M., C.M. Cymbalista, T.D. Spector, P.J. Grant, and C.I. Euro. 2007. Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:2783-2789.
- Cassidy-Bushrow, A.E., L.F. Bielak, P.F. Sheedy, 2nd, S.T. Turner, I.J. Kullo, X. Lin, and P.A. Peyser. 2007. Coronary artery calcification progression is heritable. *Circulation.* 116:25-31.
- Cesarman-Maus, G., and K.A. Hajjar. 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 129:307-321.
- Chamley, J.H., G.R. Campbell, and G. Burnstock. 1974. Dedifferentiation, redifferentiation and bundle formation of smooth muscle cells in tissue culture: the influence of cell number and nerve fibres. *J Embryol Exp Morphol.* 32:297-323.
- Chapman, G.B., W. Durante, J.D. Hellums, and A.I. Schafer. 2000. Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278:H748-754.
- Cheng, J., J. Zhang, A. Merched, L. Zhang, P. Zhang, L. Truong, A.M. Boriek, and J. Du. 2007. Mechanical stretch inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells by up-regulating integrin alphavbeta3 and stabilization of PINCH-1. *J Biol Chem.* 282:34268-34275.
- Chung, S.W., J.W. Park, S.A. Lee, S.K. Eo, and K. Kim. 2010. Thrombin promotes proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 396:748-754.
- Cintorino, M., L. Leoncini, M.T. Del Vecchio, M.M. de' Santi, E. Lavarini, M.A. Musaro, and C. Tarantino. 1986. Hematological findings in adult T-cell lymphoma by cytofluorographic analysis. Correlation with histopathology, ultrastructure and immunohistochemistry in 4 cases. *Haematologica.* 71:189-194.
- Cirillo, P., G. Cali, P. Golino, P. Calabro, L. Forte, S. De Rosa, M. Pacileo, M. Ragni, F. Scopacasa, L. Nitsch, and M. Chiariello. 2004. Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation. *Circulation.* 109:2911-2916.
- Critchley, D.R., and A.R. Gingras. 2008. Talin at a glance. *J Cell Sci.* 121:1345-1347.
- Cullen, J.P., S. Sayeed, Y. Kim, N.G. Theodorakis, J.V. Sitzmann, P.A. Cahill, and E.M. Redmond. 2005. Ethanol inhibits pulse pressure-induced vascular smooth muscle cell migration by differentially modulating plasminogen activator inhibitor type 1, matrix metalloproteinase-2 and -9. *Thromb Haemost.* 94:639-645.
- Cushman, M., D. Yanez, B.M. Psaty, L.P. Fried, G. Heiss, M. Lee, J.F. Polak, P.J. Savage, and R.P. Tracy. 1996. Association of fibrinogen and coagulation factors VII and VIII with cardiovascular risk factors in the elderly: the Cardiovascular Health Study. Cardiovascular Health Study Investigators. *Am J Epidemiol.* 143:665-676.

- Dardik, R., B. Shenkman, I. Tamarin, R. Eskaraev, J. Harsfalvi, D. Varon, and A. Inbal. 2002. Factor XIII mediates adhesion of platelets to endothelial cells through alpha(v)beta(3) and glycoprotein IIb/IIIa integrins. *Thromb Res.* 105:317-323.
- Denis, C., N. Methia, P.S. Frenette, H. Rayburn, M. Ullman-Cullere, R.O. Hynes, and D.D. Wagner. 1998. A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:9524-9529.
- Denis, C.V., and D.D. Wagner. 2007. Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:728-739.
- Dielis, A.W., E. Castoldi, H.M. Spronk, R. van Oerle, K. Hamulyak, H. Ten Cate, and J. Rosing. 2008. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J Thromb Haemost.* 6:125-131.
- Dinbergs, I.D., L. Brown, and E.R. Edelman. 1996. Cellular response to transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor depends on release kinetics and extracellular matrix interactions. *J Biol Chem.* 271:29822-29829.
- Dingemans, K.P., P. Teeling, J.H. Lagendijk, and A.E. Becker. 2000. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat Rec.* 258:1-14.
- Dorffler-Melly, J., L.A. Schwarte, C. Ince, and M. Levi. 2000. Mouse models of focal arterial and venous thrombosis. *Basic Res Cardiol.* 95:503-509.
- Dubois, C., L. Panicot-Dubois, G. Merrill-Skoloff, B. Furie, and B.C. Furie. 2006. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood.* 107:3902-3906.
- Dzau, V.J., R.C. Braun-Dullaeus, and D.G. Sedding. 2002. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 8:1249-1256.
- Edwards, R.L., F.R. Rickles, and A.M. Bobrove. 1979. Mononuclear cell tissue factor: cell of origin and requirements for activation. *Blood.* 54:359-370.
- Eichinger, S., G. Hron, C. Bialonczyk, M. Hirschl, E. Minar, O. Wagner, G. Heinze, and P.A. Kyrle. 2008. Overweight, obesity, and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Arch Intern Med.* 168:1678-1683.
- Eliceiri, B.P. 2001. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res.* 89:1104-1110.
- Eliceiri, B.P., and D.A. Cheresh. 2000. Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer J.* 6 Suppl 3:S245-249.
- Etchevers, H.C., C. Vincent, N.M. Le Douarin, and G.F. Couly. 2001. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development.* 128:1059-1068.
- Farrehi, P.M., C.K. Ozaki, P. Carmeliet, and W.P. Fay. 1998. Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Circulation.* 97:1002-1008.
- Fischer, M., U. Broeckel, S. Holmer, A. Baessler, C. Hengstenberg, B. Mayer, J. Erdmann, G. Klein, G. Riegger, H.J. Jacob, and H. Schunkert. 2005. Distinct heritable patterns of angiographic coronary artery disease in families with myocardial infarction. *Circulation.* 111:855-862.
- Flammer, A.J., T. Anderson, D.S. Celermajer, M.A. Creager, J. Deanfield, P. Ganz, N.M. Hamburg, T.F. Luscher, M. Shechter, S. Taddei, J.A. Vita, and A. Lerman. 2012. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation.* 126:753-767.
- Flynn, P.D., C.D. Byrne, T.P. Baglin, P.L. Weissberg, and M.R. Bennett. 1997. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood.* 89:4378-4384.
- Fox, J.E., C.D. Austin, J.K. Boyles, and P.K. Steffen. 1990. Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *J Cell Biol.* 111:483-493.
- Friedlander, M., P.C. Brooks, R.W. Shaffer, C.M. Kincaid, J.A. Varner, and D.A. Cheresh. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science.* 270:1500-1502.
- Fu, Y., Y. Zhao, Y. Liu, Y. Zhu, J. Chi, J. Hu, X. Zhang, and X. Yin. 2012. Adenovirus-mediated tissue factor pathway inhibitor gene transfer induces apoptosis by blocking the phosphorylation of JAK-2/STAT-3 pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* 24:1909-1917.

- Furie, B., and B.C. Furie. 2008. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 359:938-949.
- Galis, Z.S., R. Kranzhofer, J.W. Fenton, 2nd, and P. Libby. 1997. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 17:483-489.
- Galley, H.F., and N.R. Webster. 2004. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 93:105-113.
- Galmiche, G., C. Labat, M. Mericskay, K.A. Aissa, J. Blanc, K. Retailleau, M. Bourhim, D. Coletti, L. Loufrani, J. Gao-Li, R. Feil, P. Challande, D. Henrion, J.F. Decaux, V. Regnault, P. Lacolley, and Z. Li. 2013. Inactivation of serum response factor contributes to decrease vascular muscular tone and arterial stiffness in mice. *Circ Res.* 112:1035-1045.
- Gandrille, S. 2008. Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis. *Haematologica.* 93:812-816.
- Giachelli, C.M., L. Liaw, C.E. Murry, S.M. Schwartz, and M. Almeida. 1995. Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 760:109-126.
- Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science.* 285:1028-1032.
- Gloe, T., H.Y. Sohn, G.A. Meininger, and U. Pohl. 2002. Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin alpha(v)beta3. *J Biol Chem.* 277:23453-23458.
- Godbole, V., and D.A. York. 1978. Lipogenesis in situ in the genetically obese Zucker fatty rat (fa/fa): role of hyperphagia and hyperinsulinaemia. *Diabetologia.* 14:191-197.
- Gomibuchi, H., M. Okazaki, S. Iwai, T. Kumai, S. Kobayashi, and K. Oguchi. 2007. Development of hyperfibrinogenemia in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats: a potentially useful animal model as a complication of hypertension and hyperlipidemia. *Exp Anim.* 56:1-10.
- Gruner, S., M. Prostedna, B. Aktas, A. Moers, V. Schulte, T. Krieg, S. Offermanns, B. Eckes, and B. Nieswandt. 2004. Anti-glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis in mice with reduced alpha2beta1 levels or concomitant aspirin therapy. *Circulation.* 110:2946-2951.
- Guo, W., and F.G. Giancotti. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:816-826.
- Haga, J.H., Y.S. Li, and S. Chien. 2007. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *J Biomech.* 40:947-960.
- Harburger, D.S., and D.A. Calderwood. 2009. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 122:159-163.
- Haubner, R., W.A. Weber, A.J. Beer, E. Vabuliene, D. Reim, M. Sarbia, K.F. Becker, M. Goebel, R. Hein, H.J. Wester, H. Kessler, and M. Schwaiger. 2005. Noninvasive visualization of the activated alphavbeta3 integrin in cancer patients by positron emission tomography and [18F]Galacto-RGD. *PLoS Med.* 2:e70.
- Heerkens, E.H., L. Shaw, A. Ryding, G. Brooker, J.J. Mullins, C. Austin, V. Ohanian, and A.M. Heagerty. 2006. alphaV integrins are necessary for eutrophic inward remodeling of small arteries in hypertension. *Hypertension.* 47:281-287.
- Helgadóttir, A., G. Thorleifsson, A. Manolescu, S. Gretarsdóttir, T. Blondal, A. Jonasdóttir, A. Jonasdóttir, A. Sigurdsson, A. Baker, A. Palsson, G. Masson, D.F. Gudbjartsson, K.P. Magnusson, K. Andersen, A.I. Levey, V.M. Backman, S. Matthiasdóttir, T. Jonsdóttir, S. Palsson, H. Einarsdóttir, S. Gunnarsdóttir, A. Gylfason, V. Vaccarino, W.C. Hooper, M.P. Reilly, C.B. Granger, H. Austin, D.J. Rader, S.H. Shah, A.A. Quyyumi, J.R. Gulcher, G. Thorgeirsson, U. Thorsteinsdóttir, A. Kong, and K. Stefansson. 2007. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science.* 316:1491-1493.
- Hellstrand, P., and S. Albinsson. 2005. Stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle: role of the actin cytoskeleton. *Can J Physiol Pharmacol.* 83:869-875.
- Hemker, H.C. 2015. The application of thrombin generation in real life clinical situations. *Thromb Res.* 136:3-4.
- Hirschi, K.K., S.A. Rohovsky, L.H. Beck, S.R. Smith, and P.A. D'Amore. 1999. Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res.* 84:298-305.
- Huber, P.A. 1997. Caldesmon. *Int J Biochem Cell Biol.* 29:1047-1051.

- Husain, M., and J. Moss. 1988. Endothelium-dependent vascular smooth muscle control. *J Clin Anesth.* 1:135-145.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Intengan, H.D., G. Thibault, J.S. Li, and E.L. Schiffrin. 1999. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation.* 100:2267-2275.
- Ishida, T., M. Ishida, J. Suero, M. Takahashi, and B.C. Berk. 1999. Agonist-stimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src. *J Clin Invest.* 103:789-797.
- Ishikawa, S., K. Kario, N. Nago, K. Kayaba, J. Hiraoka, H. Matsuo, T. Goto, T. Miyamoto, A. Tsutsumi, Y. Nakamura, K. Shimada, K. Inoue, and M. Igarashi. 1997. Factor VII and fibrinogen levels examined by age, sex, and other atherosclerotic risk factors in a Japanese population. The Jichi Medical School Cohort Study. *Thromb Haemost.* 77:890-893.
- Ivey, M.E., and P.J. Little. 2008. Thrombin regulates vascular smooth muscle cell proteoglycan synthesis via PAR-1 and multiple downstream signalling pathways. *Thromb Res.* 123:288-297.
- Jackson, S.P. 2007. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 109:5087-5095.
- Jackson, S.P., and S.M. Schoenwaelder. 2003. Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nat Rev Drug Discov.* 2:775-789.
- Jin, M., I. Andricioaei, and T.A. Springer. 2004. Conversion between three conformational states of integrin I domains with a C-terminal pull spring studied with molecular dynamics. *Structure.* 12:2137-2147.
- Jirouskova, M., I. Chereshev, H. Vaananen, J.L. Degen, and B.S. Coller. 2004. Antibody blockade or mutation of the fibrinogen gamma-chain C-terminus is more effective in inhibiting murine arterial thrombus formation than complete absence of fibrinogen. *Blood.* 103:1995-2002.
- Johnson, G.J., T.R. Griggs, and L. Badimon. 1999. The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. On behalf of the Subcommittee on Animal, Cellular and Molecular Models of Thrombosis and Haemostasis of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 81:835-843.
- Johnson, P.R., L.M. Zucker, J.A. Cruce, and J. Hirsch. 1971. Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *J Lipid Res.* 12:706-714.
- Junker, R., J. Heinrich, H. Schulte, M. Erren, and G. Assmann. 1998. Hemostasis in normotensive and hypertensive men: results of the PROCAM study. The prospective cardiovascular Munster study. *J Hypertens.* 16:917-923.
- Kakar, P., and G.Y. Lip. 2007. Hypertension: endothelial dysfunction, the prothrombotic state and antithrombotic therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 5:441-450.
- Kanda, Y., K. Mizuno, Y. Kuroki, and Y. Watanabe. 2001. Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway. *Br J Pharmacol.* 132:1657-1664.
- Kato, K., Y.A. Elsayed, M. Namoto, K. Nakagawa, and K. Sueishi. 1996. Enhanced expression of tissue factor activity in the atherosclerotic aortas of cholesterol-fed rabbits. *Thromb Res.* 82:335-347.
- Kemp, P.R., D.J. Grainger, C.M. Shanahan, P.L. Weissberg, and J.C. Metcalfe. 1991. The Id gene is activated by serum but is not required for de-differentiation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem J.* 277 ( Pt 1):285-288.
- Knowles, D.W., L. Tilley, N. Mohandas, and J.A. Chasis. 1997. Erythrocyte membrane vesiculation: model for the molecular mechanism of protein sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:12969-12974.
- Konstantinides, S., K. Schafer, T. Thinner, and D.J. Loskutoff. 2001. Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation.* 103:576-583.
- Korff, T., L. Pfisterer, and M. Schorpp-Kistner. 2013. miR-663 and the miRaculous vascular smooth muscle phenotypic switch. *Circ Res.* 113:1102-1105.

- Kuhbandner, S., S. Brummer, D. Metzger, P. Chambon, F. Hofmann, and R. Feil. 2000. Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis*. 28:15-22.
- Kumar, R.M., P. Cahan, A.K. Shalek, R. Satija, A.J. Daley, H. Li, J. Zhang, K. Pardee, D. Gennert, J.J. Trombetta, T.C. Ferrante, A. Regev, G.Q. Daley, and J.J. Collins. 2014. Deconstructing transcriptional heterogeneity in pluripotent stem cells. *Nature*. 516:56-61.
- Kurz, K.D., B.W. Main, and G.E. Sandusky. 1990. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res*. 60:269-280.
- Lacolley, P., V. Regnault, A. Nicoletti, Z. Li, and J.B. Michel. 2012. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res*. 95:194-204.
- Landin, K., L. Tengborn, and U. Smith. 1990. Elevated fibrinogen and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in hypertension are related to metabolic risk factors for cardiovascular disease. *J Intern Med*. 227:273-278.
- Lee, A.J., F.G. Fowkes, G.D. Lowe, and A. Rumley. 1995. Fibrin D-dimer, haemostatic factors and peripheral arterial disease. *Thromb Haemost*. 74:828-832.
- Lee, W.L., and W.C. Liles. 2011. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr Opin Hematol*. 18:191-196.
- Lemmer, B. 1996. Chronopharmacology of hypertension. *Ann N Y Acad Sci*. 783:242-253.
- Li, J., T. Chen, D. Wang, Y. Song, and M. Hong. 2009. Expression and location of intracellular tissue factor in atherosclerosis stable plaque of ApoE(-/-) mice. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 29:457-461.
- Li, T.T., S. Larrucea, S. Souza, S.M. Leal, J.A. Lopez, E.M. Rubin, B. Nieswandt, and P.F. Bray. 2004. Genetic variation responsible for mouse strain differences in integrin alpha 2 expression is associated with altered platelet responses to collagen. *Blood*. 103:3396-3402.
- Liddington, R.C., and M.H. Ginsberg. 2002. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol*. 158:833-839.
- Lim, H.S., G.Y. Lip, and A.D. Blann. 2004. Plasma von Willebrand factor and the development of the metabolic syndrome in patients with hypertension. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:5377-5381.
- Lindenblatt, N., M.D. Menger, E. Klar, and B. Vollmar. 2005. Sustained hypothermia accelerates microvascular thrombus formation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289:H2680-2687.
- Lip, G.Y., and C.R. Gibbs. 1999. Does heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's triad revisited. *J Am Coll Cardiol*. 33:1424-1426.
- Lip, G.Y., and F.L. Li-Saw-Hee. 1998. Does hypertension confer a hypercoagulable state? *J Hypertens*. 16:913-916.
- Liu, Y.H., C.S. Chao, Y.P. Chang, and H.K. Chin. 2014. Hemostatic resuscitation for massive hemorrhage with warm fresh whole blood in a patient with severe blunt trauma. *Asian J Surg*. 37:205-207.
- Loinard, C., G. Basatemur, L. Masters, L. Baker, J. Harrison, N. Figg, J. Vilar, A.P. Sage, and Z. Mallat. 2014. Deletion of chromosome 9p21 noncoding cardiovascular risk interval in mice alters Smad2 signaling and promotes vascular aneurysm. *Circ Cardiovasc Genet*. 7:799-805.
- Lu, P.P., J.T. Liu, N. Liu, F. Guo, Y.Y. Ji, and X. Pang. 2011. Pro-inflammatory effect of fibrinogen and FDP on vascular smooth muscle cells by IL-6, TNF-alpha and iNOS. *Life Sci*. 88:839-845.
- Majesky, M.W. 2007. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27:1248-1258.
- Mano, T., Z. Luo, S.L. Malendowicz, T. Evans, and K. Walsh. 1999. Reversal of GATA-6 downregulation promotes smooth muscle differentiation and inhibits intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circ Res*. 84:647-654.
- Mao, X., R. Said, H. Louis, J.P. Max, M. Bourhim, P. Challande, D. Wahl, Z. Li, V. Regnault, and P. Lacolley. 2012a. Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin alphavbeta3 pathway. *Cardiovascular research*.
- Mao, X., R. Said, H. Louis, J.P. Max, M. Bourhim, P. Challande, D. Wahl, Z. Li, V. Regnault, and P. Lacolley. 2012b. Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin alphavbeta3 pathway. *Cardiovasc Res*. 96:513-523.
- Maragoudakis, M.E., N.E. Tsopanoglou, P. Andriopoulou, and M.M. Maragoudakis. 2000. Effects of thrombin/thrombosis in angiogenesis and tumour progression. *Matrix Biol*. 19:345-351.



- Martin, K., S. Weiss, P. Metharom, J. Schmeckpeper, B. Hynes, J. O'Sullivan, and N. Caplice. 2009. Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin. *Circ Res.* 105:214-218.
- Martini, W.Z. 2007. The effects of hypothermia on fibrinogen metabolism and coagulation function in swine. *Metabolism.* 56:214-221.
- Marutsuka, K., K. Hatakeyama, Y. Sato, A. Yamashita, A. Sumiyoshi, and Y. Asada. 2002. Protease-activated receptor 2 (PAR2) mediates vascular smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex. *Thrombosis research.* 107:271-276.
- Matsumoto, Y., Y. Kawai, K. Watanabe, K. Sakai, M. Murata, M. Handa, S. Nakamura, and Y. Ikeda. 1998. Fluid shear stress attenuates tumor necrosis factor-alpha-induced tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Blood.* 91:4164-4172.
- Max, R., R.R. Gerritsen, P.T. Nooijen, S.L. Goodman, A. Sutter, U. Keilholz, D.J. Ruiters, and R.M. De Waal. 1997. Immunohistochemical analysis of integrin alpha vbeta3 expression on tumor-associated vessels of human carcinomas. *Int J Cancer.* 71:320-324.
- McBane, R.D., 2nd, R.S. Miller, N.L. Hassinger, J.H. Chesebro, Y. Nemerson, and W.G. Owen. 1997. Tissue prothrombin. Universal distribution in smooth muscle. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 17:2430-2436.
- McGuire, P.G., and T.A. Twietmeyer. 1985. Aortic endothelial junctions in developing hypertension. *Hypertension.* 7:483-490.
- McNamara, C.A., I.J. Sarembock, L.W. Gimple, J.W. Fenton, 2nd, S.R. Coughlin, and G.K. Owens. 1993. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest.* 91:94-98.
- McPherson, R. 2009. Comprendre l'influence d'un facteur de risque génétique sur la maladie du cœur. *The Beat.* 4:1-2.
- McQueen, M.B., L. Bertram, E.B. Rimm, D. Blacker, and S.L. Santangelo. 2003. A QTL genome scan of the metabolic syndrome and its component traits. *BMC Genet.* 4 Suppl 1:S96.
- Michel, J.B., O. Thauvat, X. Houard, O. Meilhac, G. Caligiuri, and A. Nicoletti. 2007. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:1259-1268.
- Michiels, C. 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 196:430-443.
- Mitra, S.K., and D.D. Schlaepfer. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.* 18:516-523.
- Monroe, D.M., and M. Hoffman. 2002. Coagulation factor interaction with platelets. *Thromb Haemost.* 88:179.
- Monroe, D.M., M. Hoffman, and H.R. Roberts. 2002. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:1381-1389.
- Morel, O., F. Toti, B. Hugel, B. Bakouboula, L. Camoin-Jau, F. Dignat-George, and J.M. Freyssinet. 2006. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:2594-2604.
- Morgan, K.G., and S.S. Gangopadhyay. 2001. Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins. *J Appl Physiol (1985).* 91:953-962.
- Morrissey, J.H., B.G. Macik, P.F. Neuenschwander, and P.C. Comp. 1993. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood.* 81:734-744.
- Moser, M., K.R. Legate, R. Zent, and R. Fassler. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science.* 324:895-899.
- Motterle, A., X. Pu, H. Wood, Q. Xiao, S. Gor, F.L. Ng, K. Chan, F. Cross, B. Shohreh, R.N. Poston, A.T. Tucker, M.J. Caulfield, and S. Ye. 2012. Functional analyses of coronary artery disease associated variation on chromosome 9p21 in vascular smooth muscle cells. *Hum Mol Genet.* 21:4021-4029.
- Musunuru, K., W.S. Post, W. Herzog, H. Shen, J.R. O'Connell, P.F. McArdle, K.A. Ryan, Q. Gibson, Y.C. Cheng, E. Clearfield, A.D. Johnson, G. Tofler, Q. Yang, C.J. O'Donnell, D.M. Becker, L.R. Yanek,

- L.C. Becker, N. Faraday, L.F. Bielak, P.A. Peyser, A.R. Shuldiner, and B.D. Mitchell. 2010. Association of single nucleotide polymorphisms on chromosome 9p21.3 with platelet reactivity: a potential mechanism for increased vascular disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 3:445-453.
- Naito, M., H. Nomura, A. Iguchi, W.D. Thompson, and E.B. Smith. 1998. Effect of crosslinking by factor XIIIa on the migration of vascular smooth muscle cells into fibrin gels. *Thromb Res.* 90:111-116.
- Natali, P.G., C.V. Hamby, B. Felding-Habermann, B. Liang, M.R. Nicotra, F. Di Filippo, D. Giannarelli, M. Temponi, and S. Ferrone. 1997. Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res.* 57:1554-1560.
- Neeves, K.B. 2015. Physiochemical artifacts in FeCl<sub>3</sub> thrombosis models. *Blood.* 126:700-701.
- Nguyen, K.T., S.R. Frye, S.G. Eskin, C. Patterson, M.S. Runge, and L.V. McIntire. 2001. Cyclic strain increases protease-activated receptor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 38:1038-1043.
- Ni, H., C.V. Denis, S. Subbarao, J.L. Degen, T.N. Sato, R.O. Hynes, and D.D. Wagner. 2000. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest.* 106:385-392.
- Nieuwenhuys, C.M., M.A. Feijge, S. Beguin, and J.W. Heemskerk. 2000. Monitoring hypocoagulant conditions in rat plasma: factors determining the endogenous thrombin potential of tissue factor-activated plasma. *Thromb Haemost.* 84:1045-1051.
- Osterud, B., and E. Bjorklid. 2006. Sources of tissue factor. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 32:11-23.
- Owens, G.K. 1998. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation. *Acta Physiol Scand.* 164:623-635.
- Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff. 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 84:767-801.
- Owens, G.K., S.M. Vernon, and C.S. Madsen. 1996. Molecular regulation of smooth muscle cell differentiation. *J Hypertens Suppl.* 14:S55-64.
- Owens, G.K., and G. Wise. 1997. Regulation of differentiation/maturation in vascular smooth muscle cells by hormones and growth factors. *Agents Actions Suppl.* 48:3-24.
- Pandolfi, A., D. Cetrullo, R. Polishuck, M.M. Alberta, A. Calafiore, G. Pellegrini, E. Vitacolonna, F. Capani, and A. Consoli. 2001. Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:1378-1382.
- Pathak, A., R. Zhao, D.M. Monroe, H.R. Roberts, B.C. Sheridan, C.H. Selzman, and G.A. Stouffer. 2006. Thrombin generation in vascular tissue. *J Thromb Haemost.* 4:60-67.
- Patterson, C., G.A. Stouffer, N. Madamanchi, and M.S. Runge. 2001. New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology. *Circ Res.* 88:987-997.
- Payeli, S.K., R. Latini, C. Gebhard, A. Patrignani, U. Wagner, T.F. Luscher, and F.C. Tanner. 2008. Prothrombotic gene expression profile in vascular smooth muscle cells of human saphenous vein, but not internal mammary artery. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 28:705-710.
- Pearson, J.D. 1999. Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 12:329-341.
- Pendurthi, U.R., L.V. Rao, J.T. Williams, and S. Idell. 1999. Regulation of tissue factor pathway inhibitor expression in smooth muscle cells. *Blood.* 94:579-586.
- Penn, M.S., M.Z. Cui, A.L. Winokur, J. Bethea, T.A. Hamilton, P.E. DiCorleto, and G.M. Chisolm. 2000. Smooth muscle cell surface tissue factor pathway activation by oxidized low-density lipoprotein requires cellular lipid peroxidation. *Blood.* 96:3056-3063.
- Penn, M.S., C.V. Patel, M.Z. Cui, P.E. DiCorleto, and G.M. Chisolm. 1999. LDL increases inactive tissue factor on vascular smooth muscle cell surfaces: hydrogen peroxide activates latent cell surface tissue factor. *Circulation.* 99:1753-1759.

- Peters, L.L., E.M. Cheever, H.R. Ellis, P.A. Magnani, K.L. Svenson, R. Von Smith, and M.A. Bogue. 2002. Large-scale, high-throughput screening for coagulation and hematologic phenotypes in mice. *Physiol Genomics*. 11:185-193.
- Pfaltzgraff, E.R., and D.M. Bader. 2015. Heterogeneity in vascular smooth muscle cell embryonic origin in relation to adult structure, physiology, and disease. *Dev Dyn*. 244:410-416.
- Phillips, G.B., T.Y. Jing, L.M. Resnick, M. Barbagallo, J.H. Laragh, and J.E. Sealey. 1993. Sex hormones and hemostatic risk factors for coronary heart disease in men with hypertension. *J Hypertens*. 11:699-702.
- Poli, K.A., G.H. Tofler, M.G. Larson, J.C. Evans, P.A. Sutherland, I. Lipinska, M.A. Mittleman, J.E. Muller, R.B. D'Agostino, P.W. Wilson, and D. Levy. 2000. Association of blood pressure with fibrinolytic potential in the Framingham offspring population. *Circulation*. 101:264-269.
- Poliseno, L., A. Cecchetti, L. Mariani, M. Evangelista, F. Ricci, F. Giorgi, L. Citti, and G. Rainaldi. 2006. Resting smooth muscle cells as a model for studying vascular cell activation. *Tissue Cell*. 38:111-120.
- Pouwels, J., J. Nevo, T. Pellinen, J. Ylanne, and J. Ivaska. 2012. Negative regulators of integrin activity. *J Cell Sci*. 125:3271-3280.
- Pozgajova, M., U.J. Sachs, L. Hein, and B. Nieswandt. 2006. Reduced thrombus stability in mice lacking the alpha2A-adrenergic receptor. *Blood*. 108:510-514.
- Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaehtgens. 2000. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*. 440:653-666.
- Qu, M.J., B. Liu, H.Q. Wang, Z.Q. Yan, B.R. Shen, and Z.L. Jiang. 2007. Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain. *J Vasc Res*. 44:345-353.
- Ramstrom, S., M. Ranby, and T.L. Lindahl. 2003. Platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant activity in clotting whole blood--different effects of collagen, TRAP and calcium ionophore A23187. *Thromb Haemost*. 89:132-141.
- Rao, G.N., P. Delafontaine, and M.S. Runge. 1995. Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 270:27871-27875.
- Rao, G.N., and M.S. Runge. 1996. Cyclic AMP inhibition of thrombin-induced growth in vascular smooth muscle cells correlates with decreased JNK1 activity and c-Jun expression. *J Biol Chem*. 271:20805-20810.
- Redmond, E.M., P.A. Cahill, M. Hirsch, Y.N. Wang, J.V. Sitzmann, and S.S. Okada. 1999. Effect of pulse pressure on vascular smooth muscle cell migration: the role of urokinase and matrix metalloproteinase. *Thromb Haemost*. 81:293-300.
- Regnault, V., C. Perret-Guillaume, A. Kearney-Schwartz, J.P. Max, C. Labat, H. Louis, D. Wahl, B. Pannier, T. Lecompte, G. Weryha, P. Challande, M.E. Safar, A. Benetos, and P. Lacolley. 2011. Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31:1226-1232.
- Remkova, A., H. Kratochvil'ova, and J. Durina. 2008. Impact of the therapy by renin-angiotensin system targeting antihypertensive agents perindopril versus telmisartan on prothrombotic state in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 22:338-345.
- Remkova, A., and H. Kratochvilova. 2000. Effect of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on haemostasis in essential hypertension. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 11:641-644.
- Reynolds, L.E., L. Wyder, J.C. Lively, D. Taverna, S.D. Robinson, X. Huang, D. Sheppard, R.O. Hynes, and K.M. Hodivala-Dilke. 2002. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med*. 8:27-34.
- Rodgers, G.M. 1988. Vascular smooth muscle cells synthesize, secrete and express coagulation factor V. *Biochim Biophys Acta*. 968:17-23.
- Rovensky, Y.A. 1998. Cellular and molecular mechanisms of tumor invasion. *Biochemistry (Mosc)*. 63:1029-1043.

- Roy, S.G., Y. Nozaki, and S.H. Phan. 2001. Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol.* 33:723-734.
- Rudd, J.H., E.A. Warburton, T.D. Fryer, H.A. Jones, J.C. Clark, N. Antoun, P. Johnstrom, A.P. Davenport, P.J. Kirkpatrick, B.N. Arch, J.D. Pickard, and P.L. Weissberg. 2002. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation.* 105:2708-2711.
- Ruegg, C., and A. Mariotti. 2003. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 60:1135-1157.
- Ruggeri, Z.M., and J. Ware. 1993. von Willebrand factor. *FASEB J.* 7:308-316.
- Ruoslahti, E., N.A. Noble, S. Kagami, and W.A. Border. 1994. Integrins. *Kidney Int Suppl.* 44:S17-22.
- Rupp, P.A., A. Czirok, and C.D. Little. 2004. alphavbeta3 integrin-dependent endothelial cell dynamics in vivo. *Development.* 131:2887-2897.
- Saenko, E.L., M. Shima, and A.G. Sarafanov. 1999. Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends Cardiovasc Med.* 9:185-192.
- Sajid, M., J.H. McKerrow, E. Hansell, M.A. Mathieu, K.D. Lucas, I. Hsieh, D. Greenbaum, M. Bogyo, J.P. Salter, K.C. Lim, C. Franklin, J.H. Kim, and C.R. Caffrey. 2003. Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Mol Biochem Parasitol.* 131:65-75.
- Samad, F., M. Pandey, and D.J. Loskutoff. 2001. Regulation of tissue factor gene expression in obesity. *Blood.* 98:3353-3358.
- Santilli, F., N. Vazzana, R. Liani, M.T. Guagnano, and G. Davi. 2012. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev.* 13:27-42.
- Sartore, S., A. Chiavegato, E. Faggini, R. Franch, M. Puato, S. Ausoni, and P. Pauletto. 2001. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res.* 89:1111-1121.
- Sawada, K., M. Naiki, H. Yago, K. Matsushita, T. Ohtsuki, K. Kitagawa, M. Matsumoto, and M. Hori. 2003. Hypertension associated with reduced plasma thrombomodulin levels and a hypercoagulable state in rats. *Clin Exp Hypertens.* 25:73-84.
- Scheen, A.J., and V. Legrand. 2003. [Clinical study of the month. The EUROPA study: cardiovascular protection with perindopril in patients with stable coronary heart disease]. *Rev Med Liege.* 58:713-716.
- Schoenwaelder, S.M., Y. Yuan, P. Cooray, H.H. Salem, and S.P. Jackson. 1997. Calpain cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin alphaIIb beta3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin clots. *J Biol Chem.* 272:1694-1702.
- Schreier, B., G. Schwerdt, C. Heise, D. Bethmann, S. Rabe, S. Mildemberger, and M. Gekle. 2016. Substance-specific importance of EGFR for vascular smooth muscle cells motility in primary culture. *Biochim Biophys Acta.* 1863:1519-1533.
- Schorr, K., E. Bretschneider, K. Fischer, J.W. Fischer, R. Pape, B.H. Rauch, A.C. Rosenkranz, and A.A. Weber. 2010. Thrombin receptors in vascular smooth muscle cells - function and regulation by vasodilatory prostaglandins. *Thromb Haemost.* 103:884-890.
- Seegers, W.H., J.F. Johnson, and C. Fell. 1954. An antithrombin reaction to prothrombin activation. *Am J Physiol.* 176:97-103.
- Shang, X., X. Lin, and S.B. Howell. 2014. Claudin-4 controls the receptor tyrosine kinase EphA2 pro-oncogenic switch through beta-catenin. *Cell Commun Signal.* 12:59.
- Shattil, S.J. 1995. Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost.* 74:149-155.
- Shimokawa, M., K. Kitaguchi, M. Kawaguchi, T. Sakamoto, M. Kakimoto, and H. Furuya. 2003. The influence of induced hypothermia for hemostatic function on temperature-adjusted measurements in rabbits. *Anesth Analg.* 96:1209-1213, table of contents.
- Siljander, P.R. 2011. Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb Res.* 127 Suppl 2:S30-33.

- Smiljanic, K., M. Obradovic, A. Jovanovic, J. Djordjevic, B. Dobutovic, D. Jevremovic, P. Marche, and E.R. Isenovic. 2014. Thrombin stimulates VSMC proliferation through an EGFR-dependent pathway: involvement of MMP-2. *Mol Cell Biochem.* 396:147-160.
- Smyth, S.S., E.D. Reis, H. Vaananen, W. Zhang, and B.S. Coller. 2001. Variable protection of beta 3-integrin--deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms. *Blood.* 98:1055-1062.
- Soff, G.A., R.W. Jackman, and R.D. Rosenberg. 1991. Expression of thrombomodulin by smooth muscle cells in culture: different effects of tumor necrosis factor and cyclic adenosine monophosphate on thrombomodulin expression by endothelial cells and smooth muscle cells in culture. *Blood.* 77:515-518.
- Solum, N.O. 1999. Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2841-2846.
- Sporn, L.A., V.J. Marder, and D.D. Wagner. 1986. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell.* 46:185-190.
- Spronk, H.M., J.I. Borissoff, and H. ten Cate. 2013. New insights into modulation of thrombin formation. *Curr Atheroscler Rep.* 15:363.
- Spronk, H.M., A.M. de Jong, H.J. Crijns, U. Schotten, I.C. Van Gelder, and H. Ten Cate. 2014. Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovasc Res.* 101:344-351.
- Stawowy, P., H. Kallisch, J.P. Veinot, A. Kilimnik, W. Prichett, S. Goetze, N.G. Seidah, M. Chretien, E. Fleck, and K. Graf. 2004. Endoproteolytic activation of alpha(v) integrin by proprotein convertase PC5 is required for vascular smooth muscle cell adhesion to vitronectin and integrin-dependent signaling. *Circulation.* 109:770-776.
- Stouffer, G.A., and S.S. Smyth. 2003. Effects of thrombin on interactions between beta3-integrins and extracellular matrix in platelets and vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1971-1978.
- Takagi, J., B.M. Petre, T. Walz, and T.A. Springer. 2002. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell.* 110:599-511.
- Takagi, J., and T.A. Springer. 2002. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev.* 186:141-163.
- Taubman, M.B., J.D. Marmur, C.L. Rosenfield, A. Guha, S. Nichtberger, and Y. Nemerson. 1993. Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca<sup>2+</sup> mobilization and protein kinase C activation. *J Clin Invest.* 91:547-552.
- Taylor, F.B., Jr., G.T. Peer, M.S. Lockhart, G. Ferrell, and C.T. Esmon. 2001. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood.* 97:1685-1688.
- Ten Cate, H., and H.C. Hemker. 2016. Thrombin Generation and Atherothrombosis: What Does the Evidence Indicate? *J Am Heart Assoc.* 5.
- Thompson, A.a.H., L. A. 1983. Manual of Haemostasis and Thrombosis F.A. Davis Company; 3rd edition edition
- Tokunou, T., T. Ichiki, K. Takeda, Y. Funakoshi, N. Iino, H. Shimokawa, K. Egashira, and A. Takeshita. 2001. Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 21:1759-1763.
- Touat, Z., L. Lepage, V. Ollivier, P. Nataf, U. Hvass, J. Labreuche, M. Jandrot-Perrus, J.B. Michel, and G. Jondeau. 2008. Dilation-dependent activation of platelets and prothrombin in human thoracic ascending aortic aneurysm. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 28:940-946.
- Tsakiris, D.A., L. Scudder, K. Hodivala-Dilke, R.O. Hynes, and B.S. Coller. 1999. Hemostasis in the mouse (*Mus musculus*): a review. *Thromb Haemost.* 81:177-188.
- Tseng, M.T., A. Dozier, B. Haribabu, and U.M. Graham. 2006. Transendothelial migration of ferric ion in FeCl<sub>3</sub> injured murine common carotid artery. *Thromb Res.* 118:275-280.

- Undas, A., T. Nowakowski, M. Ciesla-Dul, and J. Sadowski. 2011. Abnormal plasma fibrin clot characteristics are associated with worse clinical outcome in patients with peripheral arterial disease and thromboangiitis obliterans. *Atherosclerosis*. 215:481-486.
- Vemuri, G.S., J. Zhang, R. Huang, J.H. Keen, and S.E. Rittenhouse. 1996. Thrombin stimulates wortmannin-inhibitable phosphoinositide 3-kinase and membrane blebbing in CHR-288 cells. *Biochem J*. 314 ( Pt 3):805-810.
- Verrier, S., S. Pallu, R. Bareille, A. Jonczyk, J. Meyer, M. Dard, and J. Amedee. 2002. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials*. 23:585-596.
- Versteeg, H.H., J.W. Heemskerk, M. Levi, and P.H. Reitsma. 2013. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 93:327-358.
- Vidwan, P., A. Pathak, S. Sheth, J. Huang, D.M. Monroe, and G.A. Stouffer. 2010. Activation of protease-activated receptors 3 and 4 accelerates tissue factor-induced thrombin generation on the surface of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30:2587-2596.
- Viera, A.J., M. Mooberry, and N.S. Key. 2012. Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and outcomes. *J Am Soc Hypertens*. 6:243-252.
- Visel, A., Y. Zhu, D. May, V. Afzal, E. Gong, C. Attanasio, M.J. Blow, J.C. Cohen, E.M. Rubin, and L.A. Pennacchio. 2010. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature*. 464:409-412.
- Vozzi, F., F. Bianchi, A. Ahluwalia, and C. Domenici. 2014. Hydrostatic pressure and shear stress affect endothelin-1 and nitric oxide release by endothelial cells in bioreactors. *Biotechnol J*. 9:146-154.
- Vu, T.K., D.T. Hung, V.I. Wheaton, and S.R. Coughlin. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 64:1057-1068.
- Wang, W., S. Oh, M. Koester, S. Abramowicz, N. Wang, A.R. Tall, and C.L. Welch. 2016. Enhanced Megakaryopoiesis and Platelet Activity in Hypercholesterolemic, B6-Ldlr<sup>-/-</sup>, Cdkn2a-Deficient Mice. *Circ Cardiovasc Genet*. 9:213-222.
- Wang, X., and L. Xu. 2005. An optimized murine model of ferric chloride-induced arterial thrombosis for thrombosis research. *Thromb Res*. 115:95-100.
- Ware, J. 2004. Dysfunctional platelet membrane receptors: from humans to mice. *Thromb Haemost*. 92:478-485.
- White, J.G. 1987. An overview of platelet structural physiology. *Scanning Microsc*. 1:1677-1700.
- Wienke, A., A.M. Herskind, K. Christensen, A. Skytthe, and A.I. Yashin. 2005. The heritability of CHD mortality in danish twins after controlling for smoking and BMI. *Twin Res Hum Genet*. 8:53-59.
- Wood, J.P., J.R. Silveira, N.M. Maille, L.M. Haynes, and P.B. Tracy. 2011. Prothrombin activation on the activated platelet surface optimizes expression of procoagulant activity. *Blood*. 117:1710-1718.
- Woodcock-Mitchell, J., J.J. Mitchell, R.B. Low, M. Kienny, P. Sengel, L. Rubbia, O. Skalli, B. Jackson, and G. Gabbiani. 1988. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation*. 39:161-166.
- Wright, I.S. 1958. Nomenclature of blood clotting factors; acceptance by the International Committee on nomenclature of four factors, their characteristics and international number. *Can Med Assoc J*. 80:659-661.
- Wu, S.Q., and W.C. Aird. 2005. Thrombin, TNF-alpha, and LPS exert overlapping but nonidentical effects on gene expression in endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289:H873-885.
- Xiong, J.P., T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D.L. Scott, A. Joachimiak, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science*. 294:339-345.
- Xiong, J.P., T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2002. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*. 296:151-155.

- Xu, X.R., D. Zhang, B.E. Oswald, N. Carrim, X. Wang, Y. Hou, Q. Zhang, C. Lavalley, T. McKeown, A.H. Marshall, and H. Ni. 2016. Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. *Crit Rev Clin Lab Sci*:1-22.
- Yamashita, T., T. Murakami, M. Iida, M. Kuwajima, and K. Shima. 1997. Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes*. 46:1077-1080.
- Zdravkovic, S., A. Wienke, N.L. Pedersen, M.E. Marenberg, A.I. Yashin, and U. De Faire. 2002. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J Intern Med*. 252:247-254.
- Zucker, L.M., and H.N. Antoniades. 1972. Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". *Endocrinology*. 90:1320-1330.
- Zucker, S., C. Conner, B.I. DiMassmo, H. Ende, M. Drews, M. Seiki, and W.F. Bahou. 1995. Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis. *J Biol Chem*. 270:23730-23738.
- Zucker, T.F., and L.M. Zucker. 1963a. Fat accretion and growth in the rat. *J Nutr*. 80:6-19.
- Zucker, T.F., and L.M. Zucker. 1963b. Phosphatides and cholesterol in the rat body: effects of growth, diet and age. *J Nutr*. 80:20-24.
- Zwaal, R.F., and A.J. Schroit. 1997. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*. 89:1121-1132.

## **ANNEXES**

---



**Propriétés pro- et anti-coagulantes associées aux cellules musculaires lisses vasculaires.****Pro- and Anti-coagulants properties of vascular smooth muscles cells.**

Jérémy Lagrange<sup>1\*</sup>, Karima Ait Aissa<sup>2\*</sup>, Amel Mohamadi<sup>3,4</sup>, Denis Wahl<sup>3,4,5</sup>,

Patrick Lacolley<sup>3,4</sup> et Véronique Regnault<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche sur la thrombose et l'hémostase (CTH), Faculté de Médecine, Mayence, Allemagne

<sup>2</sup>Centre de recherche cardiovasculaire, Faculté de Médecine, Milwaukee, Etats-Unis d'Amérique

<sup>3</sup>INSERM, U1116, Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>4</sup>Université de Lorraine, Nancy, France

<sup>5</sup>CHU Nancy, Médecine Vasculaire, Nancy, France

\* : contribution égale.

Correspondance : Jérémy Lagrange, CTH-Centrum für Thrombose und Hämostase, Universitätsmedizin, Langenbeckstrasse 1, 55131, Mainz (Allemagne). Tel +49 (0)6131-178283, Fax +49(0)6131-178284 ; mail : jeremy.lagrange@unimedizin-mainz.de

**Résumé**

La génération de thrombine nécessite la présence des facteurs de la coagulation et d'une surface présentant des phospholipides anioniques procoagulants. Cette génération de thrombine est possible à la surface de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) apoptotique et non-apoptotique suggérant que ces cellules peuvent intervenir à plusieurs étapes de l'hémostase. Historiquement, les cellules de la paroi vasculaire connues pour être très impliquées dans l'hémostase sont les cellules endothéliales (CEs). Cependant les CMLVs sont directement en contact avec le sang en cas de brèche vasculaire. De ce fait, bien que leurs rôles premiers résident dans le maintien du tonus vasculaire et la production de protéines matricielles, la question se pose de leur implication directe et/ou indirecte dans certaines étapes de l'hémostase. Cette question est d'autant plus pertinente que les CMLVs comme les CEs, de manière constitutive, ou en réponse à une stimulation, synthétisent un large panel de molécules de la

coagulation, qu'elles soient procoagulantes (facteur tissulaire, facteur II et V) ou anticoagulantes (inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, thrombomoduline, protéine C, récepteur endothélial de la protéine C). Des récepteurs cellulaires à la thrombine (protease activated receptors) ont été découverts à la surface des CMLVs et les effets mitogènes de la thrombine *via* ces récepteurs sont bien décrits. Nous nous proposons ici de regrouper les différentes études qui ont été réalisés sur les CMLVs en lien avec les molécules pro-, et anti-coagulantes et d'envisager l'impact potentiel de ces cellules sur la génération de thrombine, que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques.

**Mots clés :** cellules musculaires lisses vasculaires, coagulation, pulsatilité, athérosclérose, hypertension.

### **Abstract**

Thrombin generation is determined by the presence of coagulation factors and a procoagulant phospholipid surface. Vascular smooth muscle cells (VSMC) can support thrombin generation and could thus possess a potential role in hemostasis. Although the endothelial cells (EC) are known to be directly implicated in blood hemostasis. VSMC are in contact with blood in cases of vascular injury. That is why, even if the main purpose of VSMC is to regulate vascular tone and extracellular matrix composition, we provide evidence that these cells could be an important and underestimated modulator of the hemostasis processes. This question is even more interesting when we take into account that many clotting factors are synthesized by VSMC as well by EC, some of which are procoagulant (tissue factor, factor II and V), and others anticoagulant (tissue factor pathway inhibitor, protein C, thrombomodulin, endothelial protein C receptor). However, since the discovery of thrombin cellular receptors (PARs) on VSMC, the potential actions of coagulation factors on VSMC migration or secretion have been considered but not the potential implication of VSMC themselves in thrombin generation. In this review we will present studies that search out links between VSMC and coagulation with emphasis on studies looking at the potential impact of VSMC on coagulation in normal and in pathological conditions.

## **Introduction**

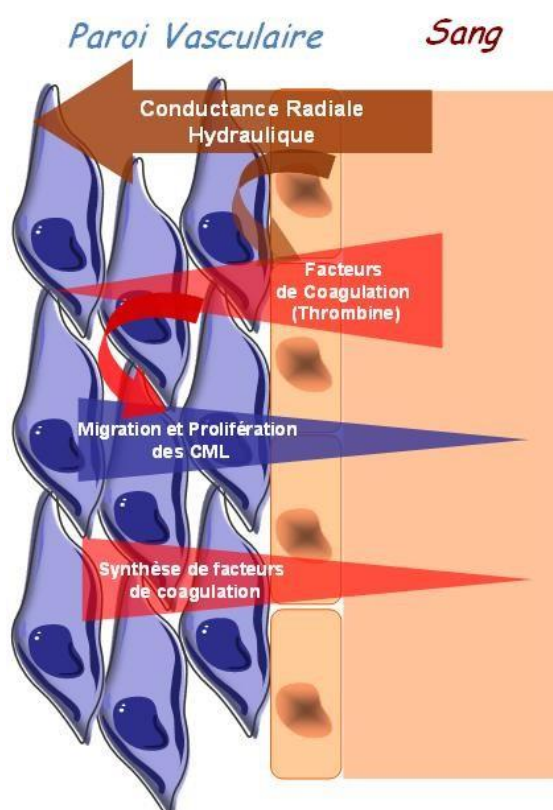
La fonction la plus connue des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) concerne la vasomotricité qui conditionne l'irrigation sanguine des organes. Sa régulation est assurée d'une part, par le système nerveux autonome et d'autre part, par le monoxyde d'azote produit de façon intrinsèque par les cellules endothéliales [1]. Lors de brèches vasculaires, les CMLVs des vaisseaux lésés exercent un effet vasoconstricteur et l'exposition du collagène présent au niveau du sous-endothélium favorise l'activation et l'agrégation plaquettaire aboutissant à la formation de thrombi plaquettaires et fibrino-cruoriques. Les CMLVs se trouvent alors au contact du plasma et des cellules sanguines et pourraient être directement et/ou indirectement impliquées dans la régulation de l'hémostase. La synthèse de molécules procoagulantes par les CMLVs suggère également que ces cellules pourraient de façon autonome générer de la thrombine au niveau pariétal. Cette thrombine tissulaire pourrait exercer des effets cellulaires ou des effets coagulants au sein de la paroi.

Depuis une quinzaine d'années, et la découverte de récepteurs de type « protease-activated receptor » (PAR) à la surface des CMLVs [2, 3], le rôle de la thrombine ou encore celui des facteurs de la coagulation sur les CMLVs ont été mis en lumière. Ainsi, la thrombine régule de très nombreuses fonctions au niveau de ces cellules telles que la différenciation, la migration, l'inflammation, la synthèse d'ADN et l'expression de certains gènes [4-8]. Une des caractéristiques majeures de la thrombine est son effet pléiotropique, aussi bien dans le compartiment sanguin que pariétal. Les déterminants de la génération de thrombine par les cellules vasculaires ainsi que les quantités de thrombine générées ne sont pas connues et jouent probablement un rôle majeur dans les effets thrombotiques et cellulaires de la thrombine.

En raison de la conductance radiale hydraulique, la paroi artérielle est constamment soumise à la convection de molécules circulantes plasmatiques [9]. Par ce processus, les

facteurs de coagulation en fonction de leurs tailles pourraient se retrouver en contact direct avec les CMLVs et ce même en l'absence de brèche vasculaire. Cette convection physiologique des peptides ou des macromolécules du plasma vers la paroi est la principale source de stimuli extrinsèques, qui, avec des délais variables, peut modifier le phénotype des CMLVs (surcharge lipidique, hyperglycémie ou influence de zymogènes tels que les facteurs de coagulation) (Figure 1). En réponse à des changements de forces de convection, qu'ils soient physiologiques comme le vieillissement ou pathologiques comme l'hypertension, l'athérosclérose ou les anévrismes de l'aorte, les CMLVs peuvent modifier leur phénotype par des voies de signalisation de type ligands / récepteurs.

Nous proposons dans la présente revue de faire une synthèse des travaux ayant étudié le rôle des facteurs de coagulation et la génération de thrombine au niveau des CMLVs dans leur environnement matriciel.



**Figure 1 :** Transfert bidirectionnel des facteurs de coagulation entre la paroi artérielle et le sang

### **Les cellules musculaires lisses vasculaires dans l'hémostase**

Les CMLVs représentent la composante cellulaire principale de la média. Ces cellules peu différenciées sont issues du mésoderme et arrangées de façon concentrique. De 2 à 5µm de diamètre pour une longueur très variable selon le tissu, elles sont généralement fusiformes et uninuclées (contrairement aux cellules musculaires squelettiques qui sont plurinuclées).

#### *Synthèse des facteurs de coagulation par les CMLVs*

La proximité des CMLVs avec le sang, variable en fonction du site vasculaire, contenant la majorité des facteurs de la coagulation ainsi que la présence du collagène dans le sous-endothélium intervenant dans l'agrégation plaquettaire, laisse présager d'une implication de ces cellules dans les processus de l'hémostase. Par ailleurs, celles-ci expriment un grand nombre de molécules et de récepteurs ayant un rôle clé dans la coagulation (tableau 1). En effet, les CMLVs synthétisent notamment du facteur tissulaire (FT), que ce soit de manière constitutive, ou en réponse à une stimulation [10, 11]. Ce facteur est exprimé par les CMLVs mais à un niveau variable en fonction de la localisation du vaisseau dans l'arbre vasculaire [12]. Il a également été montré par diverses études que le FT pouvait être produit suite à la stimulation des CMLVs par les lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées [13]. D'autres études ont rapporté que les CMLVs peuvent également exprimer certains facteurs de coagulation comme la prothrombine (FII) [14] et le facteur V (FV) [15]. Les CMLVs possèdent également des propriétés anticoagulantes car elles expriment l'inhibiteur de la voie du FT de type 1 (TFPI 1) [12, 16-18]. Un autre système anticoagulant qui pourrait intervenir à la surface des CMLVs est celui de la protéine C activée (PCa). En effet, le récepteur de la protéine C (EPCR) [19] et celui de la thrombomoduline (TM) [20] sont présents à la surface des CMLVs. Ces dernières jouent un rôle crucial dans la conversion de la protéine C (PC) en PCa par la thrombine et peuvent être

libérées sous forme soluble dans le plasma où elles contribuent à la régulation non seulement de la coagulation mais aussi celui de l'inflammation qui lui est souvent associée [21].

**Tableau 1 :** Les facteurs de coagulation synthétisés par les cellules musculaires lisses vasculaires

<b>Facteur de coagulation</b>	<b>Fonction</b>	<b>Type de synthèse</b>	<b>Références</b>
FT	Récepteur	Constitutive ou inductible sous l'action de facteurs de croissance (sérum, PDGF, EGF)	[11]
FII	Zymogène	Constitutive	[14]
FV	Procofacteur	Constitutive	[15]
TFPI 1	Inhibiteur	Inductible sous l'action de facteurs de croissance (sérum, PDGF, FGF)	[16-18]
TM	Récepteur	Inductible sous l'action de cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ )	[20]
EPCR	Récepteur	Constitutive	[19]

#### *Génération de thrombine à la surface des CMLVs*

La première mise en évidence de la capacité des CMLVs à permettre la conversion de prothrombine en thrombine, étape clé de la coagulation, remonte à la fin des années 1990. Cette démonstration a été faite par Flynn *et coll* [22] qui ont mesuré la thrombine générée à la surface des CMLVs apoptotiques en absence de plaquettes. Celle-ci est inhibée par l'annexine V de manière concentration-dépendante, ce qui montre l'importance des phospholipides chargés négativement exposés à la face externe des cellules apoptotiques. Par la suite, Pathak *et al* [23] ont montré que la thrombine pouvait être générée à la surface de CMLVs non apoptotiques et à la surface des sections artérielles de l'artère mammaire humaine de type musculaire dépourvues d'adventice. Cette génération de thrombine est inhibée par un anticorps anti-FT et le pic de thrombine est dépendant de la quantité de FT ajoutée au milieu réactionnel. Plus récemment, Campbell *et al* [24] ont comparé la génération de thrombine et la fibrine formée à

la surface de CMLVs humaines, de CEs issues de cordon ombilical humain (HUVECs *pour Human Umbilical Endothelial Cells*) ou au niveau des lignées de fibroblastes adhérents. Le pic de thrombine générée à la surface des fibroblastes et des CMLVs est beaucoup plus important que celui mesuré à la surface des HUVECs. Les HUVECs traitées avec du TNF- $\alpha$  acquièrent une capacité à former un réseau de fibrine proche de celle des CMLVs, ce qui souligne l'influence de l'inflammation sur le phénotype thrombotique de la paroi. Si la concentration en FT actif est un déterminant majeur de la quantité de thrombine générée à la surface de ces cellules, l'ensemble des mécanismes impliqués et leurs cinétiques d'action dans la génération-inhibition de la thrombine à la surface des CMLVs reste à élucider.

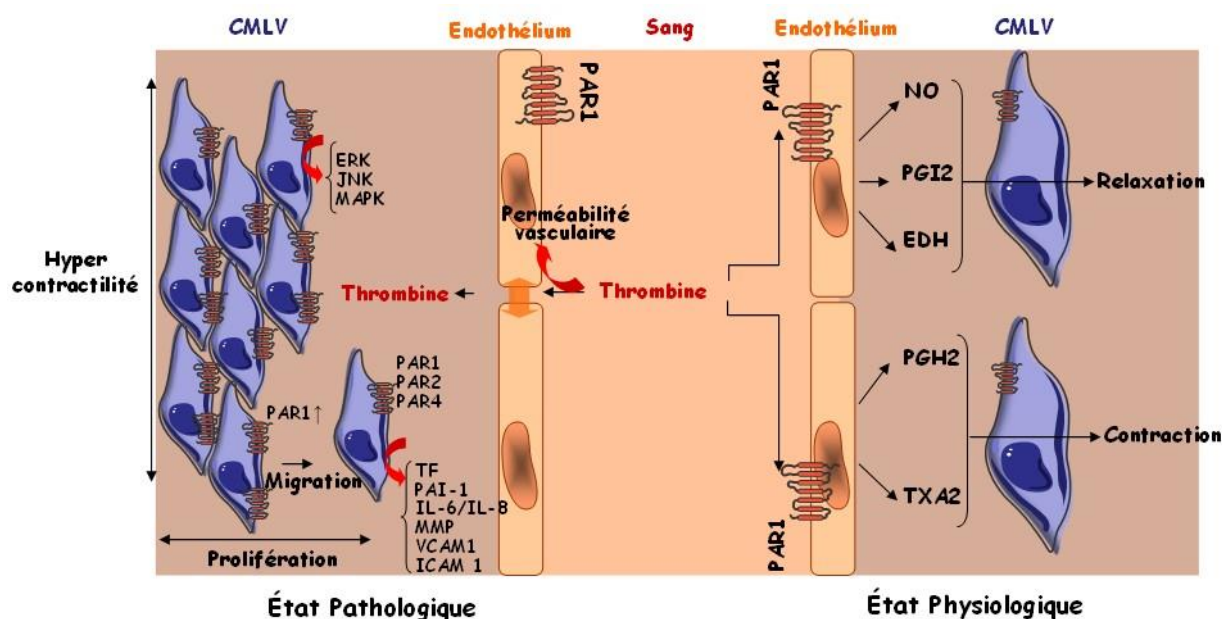
Les liens qui unissent les CMLVs à la coagulation sont à double sens. Un exemple de ces interactions concerne l'augmentation de la génération de thrombine FT-dépendante à la surface de CMLVs aortiques en présence de faibles concentrations d' $\alpha$ -thrombine [25]. L'activation des récepteurs PAR3 et PAR4 des CMLVs par la thrombine induit une augmentation d'expression du FT et de la phosphatidylsérine à la face externe des membranes.

#### *Effets cellulaires de la thrombine*

La thrombine a des effets sur la plupart des fonctions biologiques de la paroi vasculaire tels que la prolifération, la différenciation, la migration des CMLVs ou des CEs, la réponse inflammatoire, la production de la matrice extracellulaire (MEC), le développement vasculaire, l'athérogénèse et l'angiogénèse [26]. Vu et *coll* ont découvert le premier récepteur de la thrombine appartenant à la famille des récepteurs PARs : PAR1 [27]. La thrombine, *via* ce récepteur, permet la vasoconstriction ou la vasodilatation des vaisseaux en fonction des agonistes libérés par l'activation des CMLVs (Figure 2). En pathologie, la thrombine peut agir comme un facteur de croissance participant à la régulation de la prolifération des CMLVs dans le remodelage vasculaire. Ce remodelage intervient dans les processus d'athérosclérose, d'hypertension et de resténose. Ce sont les récepteurs PAR1, 2 et 4, présents à la surface des



CMLVs qu'isont responsables de ses effets sur la migration [28], la prolifération et l'hypertrophie [29]. En réponse à des contraintes mécaniques (déformation de l'ordre de 20%), il existe une augmentation de l'expression de PAR1 par les CMLVs, qui participe à la prolifération cellulaire induite par la thrombine [30]. Les voies de signalisation induites par l'activation des PARs impliquent les MAP- kinases : ERK, JNK et p38 [31-33]. La thrombine joue également un rôle critique dans les processus d'inflammation [6], en induisant l'expression de facteurs inflammatoires tels que l'interleukine-6 (IL-6) [34] ou en augmentant la sécrétion des métalloprotéinases (MMPs) qui dégradent la MEC et accélèrent le remodelage vasculaire [35, 36] (Figure 2).



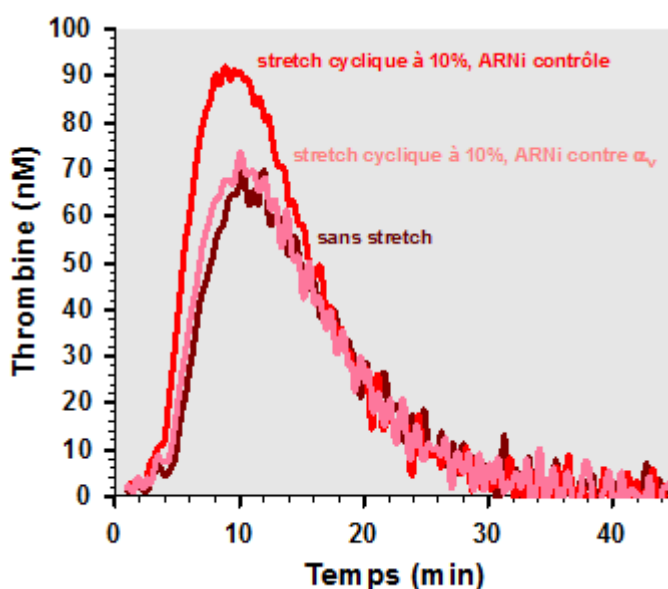
**Figure 2 :** Effets cellulaires physiologiques et pathologiques de la thrombine

### **Influence de la pression artérielle sur le phénotype des CMLVs**

Les CMLVs, au même titre que les CEs, réagissent à la pulsativité liée au flux sanguin et à la pression artérielle. Ainsi, Matsumoto et *coll* [37] ont montré, en 1998, que les déformations appliquées aux CEs diminuaient l'expression de TNF- $\alpha$  induite par le TF. De même, les CMLVs semblent sensibles aux contraintes mécaniques que subissent les vaisseaux sanguins. Dès 1999, Redmond et *coll* [38] ont montré que la pression pulsée, appliquée à des CMLVs en co-culture avec des CEs au niveau d'un capillaire soumis à un flux, induisait une augmentation de l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) agissant sur la migration des CMLVs. Redmond et *coll* ont également montré en 2005 que l'éthanol inhibe les effets de la pression pulsée sur la migration des CMLVs en augmentant de 3 à 4 fois l'expression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), et en diminuant l'expression des MMPs [39].

L'exposition des CMLVs à des étirements cycliques résultants du débit sanguin pulsatile et de l'amincissement de la paroi pendant la systole déclenche des signaux intracellulaires par des «mécano-capteurs » comme les intégrines, les récepteurs à tyrosine kinase et les canaux ioniques [40]. Il a été démontré que la mécanotransduction *via* les intégrines est responsable de la modulation du phénotype des CMLVs et de leurs fonctions canoniques CMLVs. La mécanotransduction cellulaire induit une expression rapide et transitoire de molécules régulatrices aussi bien que structurales telles que des facteurs de transcription, des molécules de signalisation, des facteurs de croissance et des protéines du cytosquelette [41-44]. Concernant les facteurs de coagulation, nous avons montré que l'application d'une déformation mécanique de l'ordre de 10% à 1 Hertz pendant 48 heures augmente la synthèse et la sécrétion du TFPI 1 par les CMLVs *in vitro* [45]. Ainsi, les forces d'étirement cycliques pourraient moduler, *in fine*, la génération de thrombine à la surface des

CMLVs, ses capacités de prolifération ou d'apoptose en fonction de leur microenvironnement mécanique[46]. *In vitro*, on sait par exemple que les variations de la génération de thrombine avec le niveau des contraintes pulsatiles est dépendante de l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (figure 3)[47].



**Figure 3** : Génération de thrombine à la surface de CMLVs soumises ou non à 6 h de stretch cyclique (10%, 1 Hz) 72 h après transfection avec des ARN interférants contrôle ou ciblant la sous-unité  $\alpha_v$ .

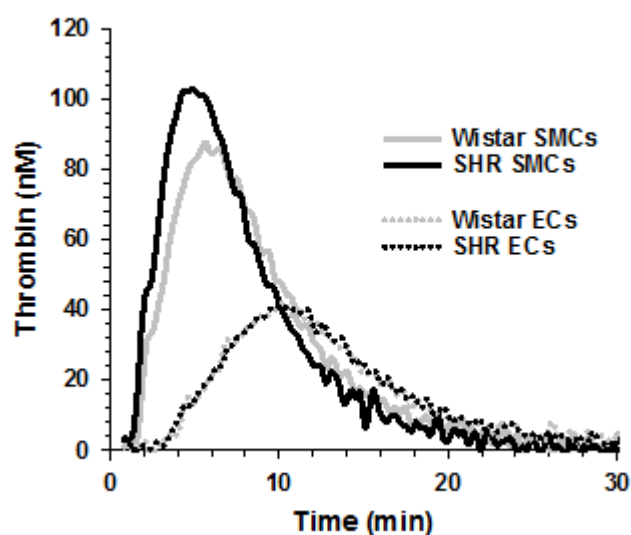
### **Impact des CMLVs sur les pathologies de la paroi artérielle**

La modification phénotypique des CMLVs est impliquée très précocement dans les pathologies des vaisseaux augmentant les risques d'événements thrombotiques accompagnant l'hypertension, l'athérosclérose ou le vieillissement accéléré [48]. Dans l'athérosclérose les CMLVs ont un rôle important dans la constitution de la plaque puisqu'elles vont migrer de la média vers l'intima en adoptant un phénotype plutôt de de type prolifératif et inflammatoire.

Le rôle de certains facteurs de coagulation ont été étudiés en pathologie. Ainsi le complexe FT/FVIIa est impliqué dans la migration *via* PAR2 et dans la prolifération *via* la voie

de phosphorylation ERK [49, 50]. Le FXIII lui serait plutôt impliqué dans l'adhésion des CMLVs [51]. De son côté, le fibrinogène, présent dans le noyau nécrotique, induit la synthèse de molécules proinflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  [52].

Récemment, nous avons montré que le phénotype prothrombotique observé chez les rats spontanément hypertendus (rats SHR) provient en partie de la capacité des CMLVs à supporter une plus grande génération de thrombine. Cette augmentation est corrélée avec une élévation de la quantité de phospholipides procoagulants présents à la surface des CMLVs [53].



**Figure 4** : Génération de thrombine à la surface de CMLVs et de CEs aortique de rats Wistar et de rat spontanément hypertendu (SHR)

Concernant l'athéromatose et la rupture de la plaque, un certain nombre d'éléments suggèrent une implication directe des CMLVs. L'état apoptotique des CMLVs qui favorise leur capacité à servir de support cellulaire pour la génération de thrombine [22], peut être induit par la synthèse locale de TFPI [46]. Pour le FT, qui est présent au niveau de la plaque d'athérome, son activité augmente, et son expression est corrélée à la thrombogénicité des plaques [54]. Au niveau des CMLVs, la présence de LDL augmente la production d'une forme inactive de FT qui peut être rendue active par du peroxyde d'hydrogène [55]. En 2009, des travaux menés sur des souris ApoE (-/-) ont permis de montrer que le FT est augmenté au niveau des cellules de la plaque [56]. Dans la pathologie anévrysmale de l'aorte ascendante il existe une augmentation de la génération de thrombine *in vivo* au niveau des CMLVs qui est corrélée à la dilatation de l'aorte. La démonstration de la présence de thrombine à l'intérieur de la couche médiane de la paroi aortique renforce cette observation [57].

Le Tableau II résume les principales données de la littérature sur les facteurs de coagulation, leurs effets au niveau du phénotype des CMLVs et les événements thrombotiques.

**Tableau II** : Facteurs de la coagulation influençant les fonctions des CMLVs et r l'hémostase

Facteur de coagulation	Modifications et voies d'action sur les CMLVs	Répercussion sur l'hémostase	Réf
	<i>Action via les récepteurs PARs sur :</i>		
	Différenciation par RhoA et la myocardine	ND	
	Expression d'IL-6 et IL-8 <i>via</i> Akt, PKC et MAPK / Synthèse de proteoglycanes	Prothrombotique	
FII et FIIa	Augmentation de la taille des glycosaminoglycanes	Potentiellement pro-thrombotique par augmentation de l'incorporation de LDL et développement de la plaque d'athérome	[4-8]
	Synthèse d'ADN suite à l'expression de FGF-2 <i>via</i> PI3K-Akt-Fra-1	ND	
FT/FVII	Prolifération <i>via</i> activation de PAR2	ND	[49, 50]
TFPI	Apoptose par inhibition des voies JAK-2/STAT-3 et survivine	Potentiellement prothrombotique	[46]
FXIIIa/Fibrinogène	Migration des CMLVs	ND	[51]
Fibrinogène, fibrine et D-dimères de fibrine	Induction de la synthèse d'IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS	Stimulation par des facteurs de croissance (sérum, PDGF, EGF)	[52]

**PARs** : Récepteurs activés par protéases ; **RhoA** : Famille A des gènes homologues de Ras ; **IL-6** : Interleukin 6 ; **IL-8** : Interleukine 8 ; **Akt** : Protéine kinase B ; **PKC** : Protéine kinase C ; **Fra-1** : Antigène 1 apparenté au fos ; **MAPK** : Protéine kinase à activité mitogène ; **PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase ; **FGF-2** : Facteur de croissance 2 des Fibroblastes ; **LDL** : Lipoprotéine de faible densité ; **JAK-2** : Kinase Janus 2 ; **STAT-3** : Transducteur de signal et activateur de transduction 3 ; **TNF- $\alpha$**  : Facteur nécrotique de tumeurs-  $\alpha$  ; **iNOS** : NO synthase inductible ; **ND** : Non défini

## **Conclusion**

L'interaction entre les CMLVs et la génération de thrombine doit désormais faire partie d'un processus reconnu comme intervenant directement ou indirectement dans l'hémostase et les pathologies liées. Ces cellules synthétisent des molécules de la coagulation et sont capables, au même titre que les plaquettes d'être, dans certaines circonstances, un support cellulaire pour la génération de thrombine. Leurs modifications phénotypiques précoces dans des situations pathologiques telles que l'athérosclérose augmentent leur potentiel prothrombotique par la synthèse de FT. Des remaniements membranaires conduisant à l'exposition de phospholipides anioniques jouent sûrement un rôle amplificateur dans la formation d'un thrombus. Dans les années futures, il serait intéressant d'étudier les flux de convections, notamment de ces facteurs de coagulants, entre le sang et la paroi vasculaire, pour apprécier les quantités de thrombine générée *in situ* qui va conditionner les effets cellulaires ou procoagulants des CMLVs au sein des parois de la macro-, et de la microcirculation

Rajouter un article de Tedgui

## **Références**

1. Husain M, Moss J. Endothelium-dependent vascular smooth muscle control. *J Clin Anesth* 1988; 1: 135-45.
2. Bretschneider E, Spanbroek R, Lotzer K, Habenicht AJ, Schror K. Evidence for functionally active protease-activated receptor-3 (PAR-3) in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 2003; 90: 704-9.
3. Schror K, Bretschneider E, Fischer K, Fischer JW, Pape R, Rauch BH, Rosenkranz AC, Weber AA. Thrombin receptors in vascular smooth muscle cells - function and regulation by vasodilatory prostaglandins. *Thromb Haemost* 2010; 103: 884-90.

4. Cao H, Dronadula N, Rao GN. Thrombin induces expression of FGF-2 via activation of PI3K-Akt-Fra-1 signaling axis leading to DNA synthesis and motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C172-82.
5. Wu SQ, Aird WC. Thrombin, TNF-alpha, and LPS exert overlapping but nonidentical effects on gene expression in endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H873-85.
6. Chung SW, Park JW, Lee SA, Eo SK, Kim K. Thrombin promotes proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 748-54.
7. Ivey ME, Little PJ. Thrombin regulates vascular smooth muscle cell proteoglycan synthesis via PAR-1 and multiple downstream signalling pathways. *Thromb Res* 2008; 123: 288-97.
8. Martin K, Weiss S, Metharom P, Schmeckpeper J, Hynes B, O'Sullivan J, Caplice N. Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin. *Circ Res* 2009; 105: 214-8.
9. Michel JB, Thauinat O, Houard X, Meilhac O, Caligiuri G, Nicoletti A. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1259-68.
10. Osterud B, Bjorklid E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 11-23.
11. Taubman MB, Marmur JD, Rosenfield CL, Guha A, Nichtberger S, Nemerson Y. Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca<sup>2+</sup> mobilization and protein kinase C activation. *J Clin Invest* 1993; 91: 547-52.
12. Payeli SK, Latini R, Gebhard C, Patrignani A, Wagner U, Luscher TF, Tanner FC. Prothrombotic gene expression profile in vascular smooth muscle cells of human saphenous vein, but not internal mammary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 705-10.
13. Penn MS, Cui MZ, Winokur AL, Bethea J, Hamilton TA, DiCorleto PE, Chisolm GM. Smooth muscle cell surface tissue factor pathway activation by oxidized low-density lipoprotein requires cellular lipid peroxidation. *Blood* 2000; 96: 3056-63.



14. McBane RD, 2nd, Miller RS, Hassinger NL, Chesebro JH, Nemerson Y, Owen WG. Tissue prothrombin. Universal distribution in smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2430-6.
15. Rodgers GM. Vascular smooth muscle cells synthesize, secrete and express coagulation factor V. *Biochim Biophys Acta* 1988; 968: 17-23.
16. Pendurthi UR, Rao LV, Williams JT, Idell S. Regulation of tissue factor pathway inhibitor expression in smooth muscle cells. *Blood* 1999; 94: 579-86.
17. Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, Peterson TE, Broze GJ, Jr., Simari RD. Expression of tissue factor pathway inhibitor in vascular smooth muscle cells and its regulation by growth factors. *Circ Res* 1998; 83: 1264-70.
18. Bajaj MS, Steer S, Kuppuswamy MN, Kisiel W, Bajaj SP. Synthesis and expression of tissue factor pathway inhibitor by serum-stimulated fibroblasts, vascular smooth muscle cells and cardiac myocytes. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1663-72.
19. Bretschneider E, Uzonyi B, Weber AA, Fischer JW, Pape R, Lotzer K, Schror K. Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor. *Circ Res* 2007; 100: 255-62.
20. Soff GA, Jackman RW, Rosenberg RD. Expression of thrombomodulin by smooth muscle cells in culture: different effects of tumor necrosis factor and cyclic adenosine monophosphate on thrombomodulin expression by endothelial cells and smooth muscle cells in culture. *Blood* 1991; 77: 515-8.
21. Gandrille S. Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis. *Haematologica* 2008; 93: 812-6.
22. Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood* 1997; 89: 4378-84.
23. Pathak A, Zhao R, Monroe DM, Roberts HR, Sheridan BC, Selzman CH, Stouffer GA. Thrombin generation in vascular tissue. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 60-7.

24. Campbell RA, Overmyer KA, Selzman CH, Sheridan BC, Wolberg AS. Contributions of extravascular and intravascular cells to fibrin network formation, structure, and stability. *Blood* 2009; 114: 4886-96.
25. Vidwan P, Pathak A, Sheth S, Huang J, Monroe DM, Stouffer GA. Activation of protease-activated receptors 3 and 4 accelerates tissue factor-induced thrombin generation on the surface of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:2587-96.
26. Patterson C, Stouffer GA, Madamanchi N, Runge MS. New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology. *Circ Res* 2001; 88: 987-97.
27. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991; 64: 1057-68.
28. McNamara CA, Sarembock IJ, Gimple LW, Fenton JW, 2nd, Coughlin SR, Owens GK. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest* 1993; 91: 94-8.
29. Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res* 2009; 82: 392-403.
30. Nguyen KT, Frye SR, Eskin SG, Patterson C, Runge MS, McIntire LV. Cyclic strain increases protease-activated receptor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2001; 38: 1038-43.
31. Rao GN, Delafontaine P, Runge MS. Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 27871-5.
32. Rao GN, Runge MS. Cyclic AMP inhibition of thrombin-induced growth in vascular smooth muscle cells correlates with decreased JNK1 activity and c-Jun expression. *J Biol Chem* 1996; 271: 20805-10.
33. Kanda Y, Mizuno K, Kuroki Y, Watanabe Y. Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1657-64.

34. Tokunou T, Ichiki T, Takeda K, Funakoshi Y, Iino N, Shimokawa H, Egashira K, Takeshita A. Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1759-63.
35. Zucker S, Conner C, DiMassmo BI, Ende H, Drews M, Seiki M, Bahou WF. Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis. *J Biol Chem* 1995; 270: 23730-8.
36. Galis ZS, Kranzhofer R, Fenton JW, 2nd, Libby P. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 483-9.
37. Matsumoto Y, Kawai Y, Watanabe K, Sakai K, Murata M, Handa M, Nakamura S, Ikeda Y. Fluid shear stress attenuates tumor necrosis factor-alpha-induced tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Blood* 1998; 91: 4164-72.
38. Redmond EM, Cahill PA, Hirsch M, Wang YN, Sitzmann JV, Okada SS. Effect of pulse pressure on vascular smooth muscle cell migration: the role of urokinase and matrix metalloproteinase. *Thromb Haemost* 1999; 81: 293-300.
39. Cullen JP, Sayeed S, Kim Y, Theodorakis NG, Sitzmann JV, Cahill PA, Redmond EM. Ethanol inhibits pulse pressure-induced vascular smooth muscle cell migration by differentially modulating plasminogen activator inhibitor type 1, matrix metalloproteinase-2 and -9. *Thromb Haemost* 2005; 94: 639-45.
40. Haga JH, Li YS, Chien S. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *J Biomech* 2007; 40: 947-60.
41. Chapman GB, Durante W, Hellums JD, Schafer AI. Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H748-54.
42. Cheng J, Zhang J, Merched A, Zhang L, Zhang P, Truong L, Boriek AM, Du J. Mechanical stretch inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells by up-regulating integrin alphavbeta3 and stabilization of PINCH-1. *J Biol Chem* 2007; 282: 34268-75.

43. Albinsson S, Hellstrand P. Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C772-82.
44. Qu MJ, Liu B, Wang HQ, Yan ZQ, Shen BR, Jiang ZL. Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain. *J Vasc Res* 2007; 44: 345-53.
45. Regnault V, Perret-Guillaume C, Kearney-Schwartz A, Max JP, Labat C, Louis H, Wahl D, Pannier B, Lecompte T, Weryha G, Challande P, Safar ME, Benetos A, Lacolley P. Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 1226-32.
46. Fu Y, Zhao Y, Liu Y, Zhu Y, Chi J, Hu J, Zhang X, Yin X. Adenovirus-mediated tissue factor pathway inhibitor gene transfer induces apoptosis by blocking the phosphorylation of JAK-2/STAT-3 pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 2012; 24: 1909-17.
47. Mao X, Said R, Louis H, Max JP, Bourhim M, Challande P, Wahl D, Li Z, Regnault V, Lacolley P. Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 pathway. *Cardiovasc Res* 2012.
48. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res* 2012; 95: 194-204.
49. Cirillo P, Cali G, Golino P, Calabro P, Forte L, De Rosa S, Pacileo M, Ragni M, Scopacasa F, Nitsch L, Chiariello M. Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation. *Circulation* 2004; 109: 2911-6.
50. Marutsuka K, Hatakeyama K, Sato Y, Yamashita A, Sumiyoshi A, Asada Y. Protease-activated receptor 2 (PAR2) mediates vascular smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex. *Thromb Res* 2002; 107: 271-6.
51. Naito M, Nomura H, Iguchi A, Thompson WD, Smith EB. Effect of crosslinking by factor XIIIa on the migration of vascular smooth muscle cells into fibrin gels. *Thromb Res* 1998; 90: 111-6.

- 
52. Lu PP, Liu JT, Liu N, Guo F, Ji YY, Pang X. Pro-inflammatory effect of fibrinogen and FDP on vascular smooth muscle cells by IL-6, TNF-alpha and iNOS. *Life Sci* 2011; 88: 839-45.
  53. Aissa KA, Lagrange J, Mohamadi A, Louis H, Houppert B, Challande P, Wahl D, Lacolley P, Regnault V. Vascular Smooth Muscle Cells Are Responsible for a Prothrombotic Phenotype of Spontaneously Hypertensive Rat Arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015.
  54. Kato K, Elsayed YA, Namoto M, Nakagawa K, Sueishi K. Enhanced expression of tissue factor activity in the atherosclerotic aortas of cholesterol-fed rabbits. *Thromb Res* 1996; 82: 335-47.
  55. Penn MS, Patel CV, Cui MZ, DiCorleto PE, Chisolm GM. LDL increases inactive tissue factor on vascular smooth muscle cell surfaces: hydrogen peroxide activates latent cell surface tissue factor. *Circulation* 1999; 99: 1753-9.
  56. Li J, Chen T, Wang D, Song Y, Hong M. Expression and location of intracellular tissue factor in atherosclerosis stable plaque of ApoE(-/-) mice. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2009; 29: 457-61.
  57. Touat Z, Lepage L, Ollivier V, Nataf P, Hvass U, Labreuche J, Jandrot-Perrus M, Michel JB, Jondeau G. Dilation-dependent activation of platelets and prothrombin in human thoracic ascending aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 940-6.

## ROLE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES ET DES INTEGRINES DANS LA GENERATION DE THROMBINE DANS LE COMPARTIMENT SANGUIN ET VASCULAIRE

**Mots-clés :** génération de thrombine, intégrines, cellules musculaires lisses vasculaires, hémostasie.

Une des propriétés majeures de la thrombine est le caractère pléiotropique de ses effets physiologiques et pathologiques, à la fois dans le compartiment sanguin et tissulaire de la paroi. **Notre hypothèse** est que les changements phénotypiques des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) participent aux modifications des propriétés pro- et anticoagulantes de la paroi. **Les objectifs** ont été d'étudier : (i) le rôle prothrombotique des CMLVs dans l'hypertension chez le rat SHR et le syndrome métabolique (Smet) chez le rat Zucker, (ii) les mécanismes de régulation de la génération de thrombine par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  des CMLVs (récepteur de la pro-thrombine), et de développer des glyco-peptides fluorés pour l'imagerie permettant d'évaluer l'activité de cette intégrine dans la paroi, et (iii) d'évaluer l'effet de variants génétiques du locus 9p21 de susceptibilité aux maladies coronariennes sur le phénotype de coagulation. **Résultats :** Les CMLVs sont responsables du phénotype prothrombotique de la paroi artérielle associée à l'hypertension chez le rat SHR. Les acides gras libres et l'inflammation vasculaire augmentent la génération de thrombine dans les 2 compartiments ce qui se traduit par une fibrinolyse diminuée et une activité métallo-protéinase augmentée chez Le rat Zucker. L'invalidation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  des CMLVs diminue la génération de thrombine dans les 2 compartiments et ralentit la survenue de thrombose carotidienne en réponse à une stimulation l'angiotensine. Le traçage de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  par des glyco-peptides comprenant une séquence RGD a été validé au niveau plaquettaire et des CMLVs. La souris invalidée pour le locus 9p21 exprime un phénotype pro-thrombotique qui est retrouvé chez l'homme pour certains variants (rs10120688 et rs1333040) dans ce locus. En conclusion, la CML est un support cellulaire clé de réactions procoagulants et pourrait être impliqué via les intégrines et/ou ses récepteurs pour la thrombine dans un couplage thrombine tissulaire – rigidité cellulaire dans les pathologies vasculaires.

## ROLE OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS AND INTEGRINS IN THE THROMBIN GENERATION ON VASCULAR AND BLOOD COMPARTMENTS

**Keywords :** generation of thrombin, integrins, vascular smooth muscle cells, hemostasis.

One of the major properties of thrombin is the pleiotropic character of its physiological and pathological effects, both in the blood compartment and the tissue of the arterial wall. **We hypothesized** that the phenotypic changes of vascular smooth muscle cells (VSMCs) are involved in modifications of pro- and anti-coagulant properties of the arterial wall. The objectives were to examine: (i) the prothrombotic role of VSMCs in hypertension of SHR rats and in the metabolic syndrome (Smet) of Zucker rats, (ii) regulatory mechanisms of thrombin generation by integrin  $\alpha_v\beta_3$  of VSMCs (a pro-thrombin receptor), and to develop fluorinated glyco-peptides for imaging, to assess the activity of this integrin in the wall, and (iii) evaluate the effect of genetic variants of the 9p21 locus that give a susceptibility to coronary heart disease on the coagulation phenotype. **Results:** The VSMCs are responsible for the prothrombotic phenotype of the arterial wall associated with hypertension in SHR rats. Free fatty acids and vascular inflammation increase thrombin generation in the two compartments resulting in decreased fibrinolysis and an increased metallo-proteinase activity in the Zucker rats. The invalidation of integrin  $\alpha_v\beta_3$  of VSMCs reduced thrombin generation in the two compartments and slowed angiotensin-induced carotid thrombosis. Tracing of the integrin  $\alpha_v\beta_3$  by glyco-peptides including RGD was validated at the platelet level and VSMCs. Mice invalidated for the 9p21 locus express a prothrombotic phenotype that is found in humans for certain variants (rs10120688 and rs1333040) in this locus. **In conclusion**, the VSMC is a cell supported key to procoagulant reactions and may be involved *via* integrins and/or its receptors for thrombin in the "tissular thrombin - cell rigidity" coupling in vascular pathologies.