



HAL
open science

Impact des facteurs de risque cardio-vasculaire majeurs d'athérosclérose et du vieillissement sur la fonction endothéliale des vaisseaux fémoraux dans le risque de thrombose veineuse

Sébastien Gaertner

► To cite this version:

Sébastien Gaertner. Impact des facteurs de risque cardio-vasculaire majeurs d'athérosclérose et du vieillissement sur la fonction endothéliale des vaisseaux fémoraux dans le risque de thrombose veineuse. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ119. tel-01767999

HAL Id: tel-01767999

<https://theses.hal.science/tel-01767999v1>

Submitted on 16 Apr 2018

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

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

ECOLE DOCTORALE 414 – Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 1260, INSERM/Université de Strasbourg, Regenerative Nanomedicine

THESE

Présentée par :

Sébastien GAERTNER

Soutenue le : **15 décembre 2017**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/Spécialité : **Hématologie et physiopathologie vasculaire**

**Impact des facteurs de risque cardio-vasculaire
majeurs d'athérosclérose et du vieillissement sur
la fonction endothéliale des vaisseaux fémoraux
dans le risque de thrombose veineuse**

THESE dirigée par :

Mr STEPHAN Dominique

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BURA-RIVIERE Alessandra

Professeur, Université de Toulouse

Mr VANHOUTTE Paul

Professeur, Université de Hong-Kong, Chine

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Mr MOREL Olivier

Professeur, Université de Strasbourg

INVITEE :

Mme SCHINI-KERTH Valérie

Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements

« La pierre n'a point d'espoir d'être autre chose que pierre. Mais de collaborer, elle s'assemble et devient temple ».

Antoine de Saint-Exupéry

A Monsieur le Professeur Dominique STEPHAN, Directeur de thèse : *Cher Professeur, depuis mon internat et mon arrivée dans votre service, vous m'avez encouragé et soutenu. Bien plus qu'un chef de service, vous êtes MON chef, MON Maître, à la fois paternaliste et bienveillant. Vous m'avez poussé à développer mes compétences et mes connaissances (« soyez force de propositions ! »). Vous n'avez jamais mis de limites à mes envies de développer MA médecine vasculaire. C'est ainsi que j'ai pu m'épanouir dans votre service et pour tout cela, je ne pourrais jamais exprimer dans un « Merci » toute la gratitude que je vous porte.*

Aux membres du jury :

A Madame le Professeur Alessandra BURA-RIVIERE et Monsieur le Professeur Paul VANHOUTTE : *Merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de m'avoir consacré votre temps si précieux. C'est un sincère et grand honneur pour moi de vous voir siéger dans mon jury de thèse. Vous représentez l'ensemble de la médecine vasculaire de renom que j'admire : la Clinique, la Recherche, l'Enseignement, avec ce que cela représente de plus noble.*

A Monsieur le Professeur Olivier MOREL : *Je vous remercie de me faire l'honneur de siéger dans mon jury de thèse, mais aussi pour votre disponibilité, votre aide au quotidien, la confiance que vous m'accordez dans la pratique des soins courants et dans les collaborations que vous cherchez à construire avec nous.*

A Madame le Professeur Valérie SCHINI-KERTH : *Remercier infiniment prend tout son sens car je n'aurais cessé de vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté. Vous m'avez permis d'accéder à la recherche et ouvert des perspectives de collaborations pour des projets de recherche passionnants qui risquent de m'occuper pour le reste de ma carrière ! Je retiens surtout votre volonté positive de travailler ensemble. Vous savez motiver comme personne et à chaque entretien avec vous on ressort galvanisé et passionné. Merci de votre immense aide pour ce travail et de m'avoir transmis une partie de votre passion.*

A la Société Française de Médecine Vasculaire : *j'ai eu la chance inouïe d'avoir été le lauréat de la bourse de recherche 2016 de la SFMV. Grâce à la confiance que les membres du jury ont placée en moi, une grande partie de ce travail et surtout d'immenses perspectives de recherche ont pu voir le jour.*

Aux indispensables de la recherche :

A Madame Brigitte POLLET : *Que dire sinon que sans toi ce travail ne serait pas ! Tu m'as énormément appris à la paillasse et c'est un régal que de venir travailler avec toi. Merci !*

A Monsieur le Docteur Cyril AUGER : *Merci pour ta disponibilité, tes conseils et ton aide, même tard le soir, les dimanches et jours fériés. Merci également pour ta recette de rillettes de lapin ! Inoubliable...*

A Madame Le Professeur Florence TOTI : *Merci pour ton soutien, ton écoute et pour avoir permis à mon projet de recherche sur le Turner d'avoir pris une ampleur insoupçonnée. Ton aide aura été des plus précieuses.*

A Madame le Professeur Nelly BOEHM : *Vous m'avez permis de venir dans votre laboratoire et de réaliser en un temps record nos travaux d'histologie. Merci de vous être autant investie dans ce projet. Votre rigueur et la remise en question (permanente) des résultats m'auront énormément appris.*

A Monsieur Julien GRAAF : *Merci de m'avoir appris l'histologie pour les nuls ! Grâce à ton énorme investissement une partie de ce travail a pu voir le jour. Merci de t'être rendu autant disponible et pour ta patience.*

A mes co-doctorants : *Merci Sonia KHEMAIS-BENKHIAT pour ton aide et ton écoute au cours de ces années passées. Je me suis senti intégré dans l'équipe grâce à toi. Tu m'as permis d'avoir des discussions très intéressantes autour de tes travaux de recherche (et d'un café) ! Merci également à Farooq et Lamia pour leur aide.*

Aux indispensables de la clinique :

A Madame le Docteur Mihaela CORDEANU : *Mihaela, sur tous les fronts, tu m'as énormément aidé non seulement pour ce travail mais aussi pour m'avoir permis de me détacher un temps de l'activité de service pour mener à bien la fin de cette thèse : MERCI !*

A Madame le Docteur Alix FALLER : *Merci pour les moments inoubliables et ton aide pour perfectionner mon français. Tu vas nous manquer.*

A mes autres collègues médecins : *Merci Corina, Julie et Aude de m'avoir permis de prendre du recul par rapport à la clinique et votre aide pendant les périodes de charge de travail intense !*

Aux amis et à la famille :

A tous mes amis : *Merci pour votre soutien, votre écoute. Merci d'avoir été là pour moi et ma famille. Merci de m'accepter tel que je suis avec mes caprices.*

A mes parents : *Pour leur éternel soutien et leur aide au quotidien. Merci de toujours croire en moi*

A mes beaux-parents et à Ma : *Merci pour vos encouragements et votre présence.*

A mes enfants, Alexandre, Victor et Eléonore : *merci d'être aussi adorables et pour vos encouragements pour ce travail ! Merci pour votre compréhension « quand Papa doit travailler ». Je vous aime.*

A Elisabeth mon épouse, ma moitié et mon soutien permanent : *Merci pour ton investissement sans lequel jamais je n'aurais pu mener ce travail dans de conditions aussi sereines. Tu as fait beaucoup de sacrifices et montré un immense courage pour tout assumer. Merci pour ta patience et ta compréhension. Tu fais partie intégrante de la réalisation de ce travail. Je t'aime.*

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	1
LISTE DES TABLEAUX	4
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	8
PREREQUIS	10
MALADIE VEINEUSE THROMBO-EMBOLIQUE	10
EPIDEMIOLOGIE	10
FACTEURS DE RISQUE DE THROMBOSE VEINEUSE	12
MECANISMES DE LA THROMBOSE	14
La cascade de la coagulation	14
Les acteurs de la coagulation et de la formation du thrombus	18
FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRES D'ATHEROSCLEROSE ET RISQUE DE THROMBOSE VEINEUSE	22
FONCTION ENDOTHELIALE	23
ROLE DE LA REGULATION DE LA VASOMOTRICITE	24
Vasodilatation	25
Le monoxyde d'azote	25
Prostaglandine I ₂ ou Prostacycline	30
Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium	32
Vasoconstriction : Facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium	34
Prostanoides	36
Thromboxane A ₂	36
Les autres prostanoides	36
Endothéline 1	37
Dérivés réactifs de l'oxygène	38
Le rôle central de l'Acide Arachidonique et des Cyclo-Oxygénases	39
DYSFONCTION ENDOTHELIALE ET FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRES	42
Dysfonction endothéliale artérielle	42
Dysfonction endothéliale et âge	43
Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle	44
Dysfonction endothéliale et diabète	45
Dysfonction endothéliale et obésité	46

Dysfonction endothéliale et dyslipidémie	47
Dysfonction endothéliale veineuse	48
OMEGA-3 ET MODULATION DU METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE	50

PREMIERE ETUDE : INFLUENCE DES FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRES D'ATHEROSCLEROSE SUR LE RISQUE DE THROMBOSE VEINEUSE NON PROVOQUEE A PARTIR D'UNE ETUDE DE COHORTE PROSPECTIVE DE PATIENTS ISSUS DU REGISTRE REMOTEV **54**

INTRODUCTION	54
RESULTATS ET CONCLUSION	79

DEUXIEME ETUDE : EFFETS DU VIEILLISSEMENT SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE VASCULAIRE PERIPHERIQUE DES ARTERES ET DES VEINES FEMORALES CHEZ LE RAT WISTAR POUR L'ESTIMATION DU RISQUE DE THROMBOSE VEINEUSE LIE A L'AGE **80**

INTRODUCTION	80
RESULTATS ET CONCLUSION	106

TROISIEME ETUDE : CARACTERISATION DE LA FONCTION ENDOTHELIALE DE L'ARTERE ET DE LA VEINE FEMORALE CHEZ LE RAT ZSF1 JEUNE, UN MODELE DE SYNDROME METABOLIQUE, POUR L'ESTIMATION DU RISQUE DE THROMBOSE VEINEUSE ASSOCIEE AU CUMUL DES FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRES MAJEURS D'ATHEROSCLEROSE. **108**

INTRODUCTION	108
RESULTATS ET CONCLUSION	135

QUATRIEME ETUDE : EFFETS D'UNE FORMULATION OPTIMISEE D'OMEGA-3, L'EPA:DHA 6:1, SUR LA PREVENTION DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE VASCULAIRE PERIPHERIQUE FEMORALE LIEE A L'AGE ET LE RISQUE DE THROMBOSE VEINEUSE CHEZ LE RAT WISTAR **137**

INTRODUCTION	137
RESULTATS ET CONCLUSION	160

DISCUSSION **161**

LE LIEN CLINIQUE ENTRE LES FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRES MAJEURS D'ATHEROSCLEROSE ET LA MALADIE VEINEUSE THROMBO-EMBOLIQUE **162**

LE DEBUT DE L'HISTOIRE 162

LE LIEN EPIDEMIOLOGIQUE ENTRE FRCV ET MVTE : LE DEBAT 163

LE CUMUL DES FRCV D'ATHEROSCLEROSE EST SIGNIFICATIVEMENT ASSOCIE AU RISQUE DE MVTE NON PROVOQUEE 168

ETUDES PRE-CLINIQUES DE L'IMPACT DES FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRES MAJEURS D'ATHEROSCLEROSE SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE DE L'ARTERE ET DE LA VEINE FEMORALE DANS L'ESTIMATION DU RISQUE DE THROMBOSE VEINEUSE **171**

EFFETS DU VIEILLISSEMENT PHYSIOLOGIQUE SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE DE LA VEINE FEMORALE COMPARATIVEMENT A L'ARTERE CHEZ LE RAT WISTAR	173
EFFETS DU CUMUL DES FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRES SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE DE LA VEINE FEMORALE COMPARATIVEMENT A L'ARTERE CHEZ LE RAT ZSF1	177
EFFETS D'UN TRAITEMENT PAR UNE FORMULATION OPTIMISEE D'OMEGA-3 (EPA:DHA 6:1) SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE DE LA VEINE FEMORALE COMPARATIVEMENT A L'ARTERE CHEZ LE RAT VIEILLISSANT WISTAR.	181
CONCLUSION	185
REFERENCES	187

Liste des tableaux

Tableau 1 Facteurs de risque de MVTE classés selon leur niveau de risque

13

Liste des figures

Figure 1	Incidence de la MVTE en fonction de l'origine ethnique	10
Figure 2	Incidence annuelle de la MVTE en fonction de l'âge et du sexe	11
Figure 3	Schéma de la cascade de la coagulation	15
Figure 4	Les inhibiteurs physiologiques de la coagulation	16
Figure 5	Le système de la fibrinolyse	17
Figure 6	Les acteurs de la thrombose artérielle après une lésion endothéliale	20
Figure 7	Place des érythrocytes dans la thrombose	21
Figure 8	Structure de la paroi artérielle et veineuse	23
Figure 9	Structure de la NO synthase et de sa catalyse	27
Figure 10	Voies d'activation de la eNOS	29
Figure 11	Effets du NO dans la cellule musculaire lisse	30
Figure 12	Relaxation musculaire lisse induite par la prostacycline (PGI ₂)	31
Figure 13	Hyperpolarisation dérivée de l'endothélium	34
Figure 14	Facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium	35
Figure 15	Métabolisme et biosynthèse des eicosanoïdes et des prostanoïdes	41
Figure 16	Mécanismes de la dysfonction endothéliale	43
Figure 17	Métabolisme des acides gras poly-insaturés des séries oméga-3 et oméga-6	53

Liste des abréviations

MVTE	Maladie veineuse thrombo-embolique
TVP	Thrombose veineuse profonde
EP	Embolie pulmonaire
FRCV	Facteurs de risque cardio-vasculaire
CHRU	Centre hospitalier régional universitaire
REMOTEV	Registre monocentrique de patients hospitalisés pour un épisode thrombo-embolique veineux
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
t-PA	tissue Plasminogen Activator
u-PA	urokinase Activator Plasminogen
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
HRGP	Histidin Rich Glycoprotein
α2-AP	α 2-antiplasmine
α2-MG	α 2-macroglobuline
TXA2	Thromboxane A2
ADP	Adénosine di-phosphate
PGI2	Prostaglandine I2
IMC	Indice de masse corporelle
CE	Cellule endothéliale
EDRF	Facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium
NO	Monoxyde d'azote
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
NOS	NO synthase
eNOS	NO synthase endothéliale
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
FAD	Flavine adenine dinucleotide
FMN	Flavine mononucleotide
BH4	(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin
cGMP	guanosine 3', 5' cyclique monophosphate
MLCK	myosin light chain kinase
MLCP	myosin light chain phosphatase
PLA2	phospholipase A2
AA	Acide arachidonique
COX	Cyclooxygénase
PGG2	Prostaglandine G2
PGH2	Prostaglandine H2

AMPC	Adénosine 3',5' cyclique monophosphate
PPAR	Récepteurs activés par les proliférateurs des peroxyosomes
EDH	Hyperpolarisation dérivée de l'endothélium
SKCa	Canaux potassiques calcium-dépendants de faible conductance
IKCa	Canaux potassiques calcium-dépendants de conductance intermédiaire
BKCa	Canaux potassiques calcium-dépendants de grande conductance
ETTs	Acides epoxyeicosatriénoïques
EDCF	Facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium
TXB2	Thromboxane B2
TP	Thromboxane/prostaglandine
PGF2α	Prostaglandine F2 α
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
HETE	Acides hydroxyeicosatétraénoïques
HTA	Hypertension artérielle
FMD	Flow mediated dilation
A-FABP	Adipocyte fatty-acid binding protein
5-HPETE	Acide 5-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque
DHA	Acide docosahexaénoïque
EPA	Acide eicosapentaénoïque
PGE3	Prostaglandine E3
TXA3	Thromboxane A3
MCV	Maladies cardio-vasculaires
IPS	Index de pression systolique cheville-bras
EFOX	Electrophilic fatty acids oxo-derivatives

Introduction

La maladie veineuse thrombo-embolique (MVTE) comprend la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP). Il s'agit de la 3^{ème} pathologie cardiovasculaire la plus fréquemment rencontrée après l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux. Le mécanisme physiopathologique sous-jacent est classiquement illustré par la triade de Virchow à savoir une lésion endothéliale, une stase veineuse et un état d'hypercoagulabilité.

La MVTE, fréquente, peut avoir de lourdes conséquences pour les patients atteints puisque la maladie est mortelle ou responsable de pathologies chroniques invalidantes comme le cœur pulmonaire chronique ou le syndrome post thrombotique aux membres inférieurs. Après un premier épisode de MVTE, les patients sont exposés à un risque élevé de récurrence. Ainsi, l'identification des facteurs de risque de la MVTE est essentielle non seulement pour la prévention d'un premier épisode mais aussi pour la prévention de sa récurrence.

Malgré les avancées dans la compréhension de la maladie, près de 50% des épisodes de MVTE restent inexpliqués, sans facteur de risque identifié (ils sont dits non provoqués). Depuis quelques années, les données de la littérature médicale mettent en avant les facteurs de risque cardiovasculaires (FRCV) majeurs d'athérosclérose, habituellement associés aux maladies cardiovasculaires artérielles, comme étant potentiellement responsables d'un risque accru de MVTE. L'enjeu thérapeutique est majeur, puisque si nous disposons d'un arsenal thérapeutique permettant le traitement et la prévention de la récurrence des maladies cardiovasculaires artérielles, nous pourrions alors transposer certains traitements pharmacologiques, initialement destinés à ces patients, aux patients ayant présenté un

épisode de MVTE. Il serait également possible d'identifier de nouveaux mécanismes physiopathologiques et de nouvelles voies thérapeutiques. Les effets des FRCV sur la fonction endothéliale et la paroi artérielle sont partiellement connus, mais en dehors du lien épidémiologique entre FRCV et MVTE, nous ne savons pas quel pourrait être le mécanisme d'action des FRCV sur la fonction endothéliale veineuse et sa paroi. C'est l'objet de ce travail.

Nous avons ainsi cherché à établir dans une première partie s'il existe un lien clinique entre la MVTE et les FRCV majeurs d'athérosclérose par l'étude d'un registre prospectif de patients hospitalisés pour un épisode de MVTE au Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Strasbourg (registre REMOTEV). Dans une deuxième partie, nous avons étudié les effets du vieillissement, premier facteur de risque de thrombose veineuse et de maladies cardiovasculaires artérielles, sur la fonction endothéliale artérielle et veineuse périphérique au niveau des vaisseaux fémoraux chez le rat Wistar. Dans une troisième partie, nous avons étudié les effets de l'association de FRCV chez le rat ZSF1 jeune, sur la fonction endothéliale veineuse périphérique comparativement à l'artère périphérique. Enfin, dans une quatrième partie, nous avons cherché à évaluer si la modulation de la voie de l'acide arachidonique par une formulation optimisée d'oméga 3 (EPA:DHA 6:1) pouvait influencer les effets délétères de l'âge, premier facteur de risque de MVTE et de maladies cardiovasculaires artérielles, sur la fonction endothéliale veineuse comparativement à l'artère, au niveau des vaisseaux fémoraux de rats Wistar.

Prérequis

Maladie veineuse thrombo-embolique

Epidémiologie

L'incidence annuelle de la MVTE en Europe occidentale et en Amérique du Nord est estimée entre 0,6 et 1,83 pour mille personnes/an dans la population générale (1–3). Elle augmente en milieu institutionnel hospitalier puisqu'on l'estime en taux brut entre 0,7 et 1 cas pour mille patients hospitalisés en milieu médico-chirurgical (4,5) et 3,32 pour mille patients hospitalisés en milieu psychiatrique (6). La MVTE est donc une pathologie courante.

Cette incidence est également soumise à l'influence de l'origine ethnique puisqu'elle est plus basse dans les populations asiatiques (en moyenne 0,2 pour mille personnes par an) qu'afro-américaines (jusqu'à 7,46 pour mille personnes par an dans la cohorte Cardiovascular Health Study) (7–9) ([Figure 1](#)).

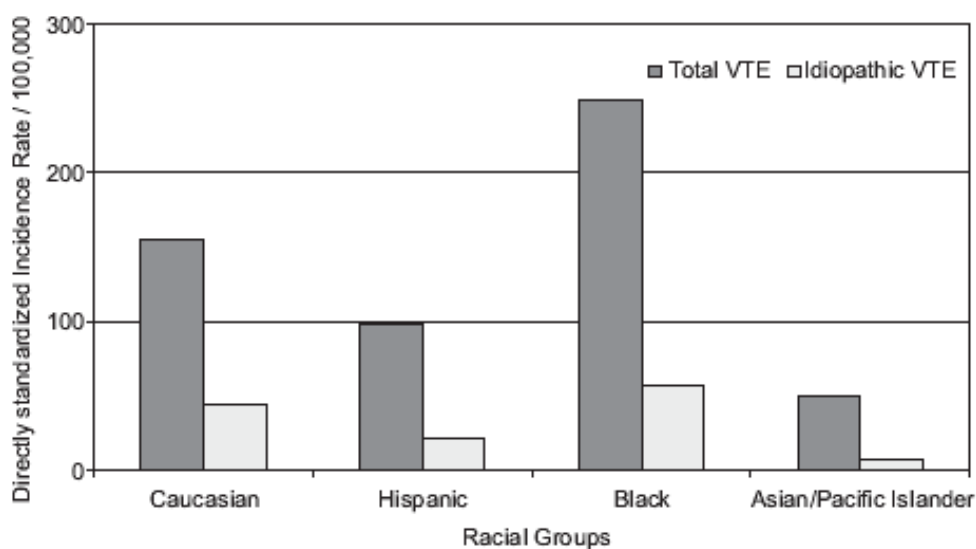


Figure 1 : Incidence de la MVTE en fonction de l'origine ethnique selon White et al. Thromb Res. 2009 (10)

L'âge est un élément déterminant dans l'incidence de la MVTE. En effet, l'incidence annuelle de la MVTE croit de manière exponentielle avec l'âge, quel que soit le sexe (Figure 2A et 2B) (2,4,9).

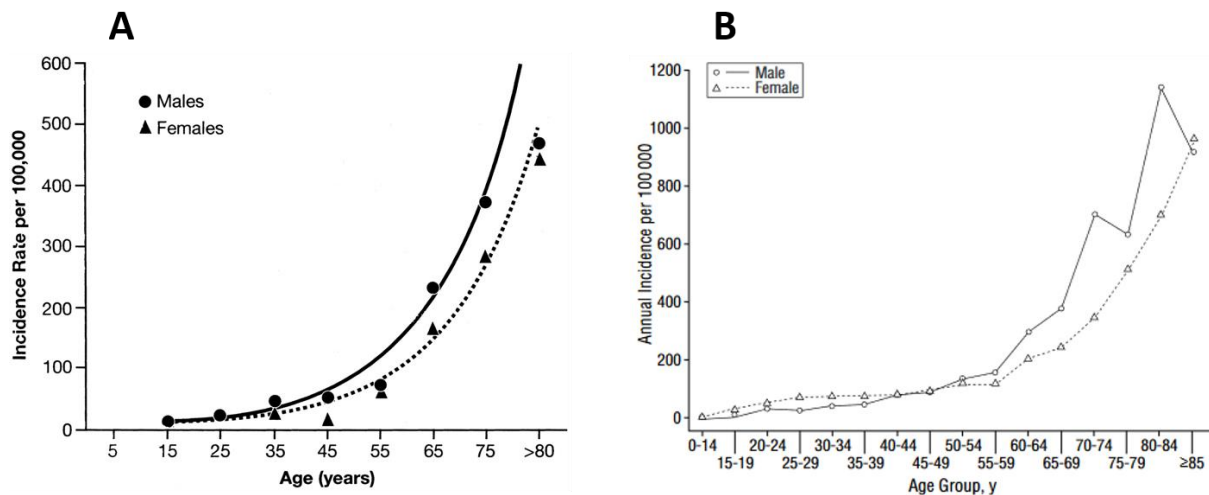


Figure 2 : Incidence annuelle de la MVTE en fonction de l'âge et du sexe. A : incidence parmi les résidents de Worcester MA 1986 (reproduit de Anderson et al. Arch Intern Med. 1991). B : Incidence parmi les résidents de Olmsted County, Minnesota, de 1966 à 1990 (reproduit de Silverstein et al. Arch Intern Med. 1998) (2,4)

Le sexe n'a pas d'influence sur l'incidence de MVTE si l'on écarte les traitements hormonaux, contraceptifs ou substitutifs, chez la femme (9).

Concernant le risque de récurrence de MVTE après un premier épisode, celui-ci augmente avec le temps : de 17,5% à 2 ans à 30,8% à 8 ans (11). La mortalité secondaire à un premier épisode de MVTE est élevée, surtout dans le premier mois suivant l'évènement, puisqu'on estime que le risque de mortalité à 30 jours est de 9,7% à 15,1% après une EP et de 4,6% à 9,4% dans la TVP (12,13).

Facteurs de risque de thrombose veineuse

Historiquement, on décrit la MVTE comme résultante de déterminants majeurs de la thrombose veineuse décrits par Rudolf Virchow au XIXe siècle, à savoir une altération de l'endothélium, une stase et un état d'hypercoagulabilité (14).

Dans certaines situations cliniques, chacun des éléments de la triade de Virchow ou leurs associations peuvent mener à la constitution d'un thrombus veineux. Ces situations sont considérées comme des facteurs de risque majeurs de thrombose veineuse. Il peut s'agir de facteurs favorisants majeurs à caractère transitoire comme la chirurgie, l'immobilisation prolongée (>3 jours), le péri-partum, le traitement hormonal contraceptif ou substitutif ou alors des facteurs persistants comme le cancer et le syndrome des antiphospholipides (15,16). On retrouve des facteurs de risque transitoires majeurs dans environ 50 % à 60% des cas de MVTE (13). La MVTE secondaire à ces situations est ainsi qualifiée de « provoquée ». Lorsqu'aucun de ces facteurs de risque transitoires majeurs de MVTE ne sont retrouvés, elle est alors qualifiée d'idiopathique ou de « non provoquée » (13).

L'ensemble des facteurs de risque de MVTE sont repris dans le [tableau 1](#).

Facteurs prédisposants	Lié au patient	Contextuel
Facteurs prédisposants majeurs (odds ratio >10)		
Fracture (hanche ou jambe)		✓
Remplacement prothétique de hanche ou genou		✓
Chirurgie générale (intervention majeure)		✓
Traumatisme majeur		✓
Lésion de la moelle épinière		✓
<hr/>		
Facteurs prédisposants modérés (odds ratio 2–9)		
Arthroscopie du genou		✓
Cathéters veineux centraux		✓
Chimiothérapie		✓
Insuffisance respiratoire ou cardiaque chronique	✓	
Traitement hormonal substitutif	✓	
Cancer	✓	
Traitement hormonal contraceptif	✓	
Paralysie secondaire à un accident vasculaire cérébral	✓	
Grossesse ou post partum		✓
Antécédent de MVTE	✓	
Thrombophilie	✓	
<hr/>		
Facteurs prédisposants faibles (odds ratio <2)		
Alitement supérieur à 3 jours		✓
Immobilisation relative (ex : voyage prolongé en avion)		✓
Âge	✓	
Chirurgie laparoscopique (ex: cholecystectomie)		✓
Obésité	✓	
Grossesse	✓	
Maladie variqueuse	✓	

Tableau 1 : Facteurs de risque de MVTE classés selon leur niveau de risque. Données issues de Torbicki et al. *Eur Heart J.* 2008 (17).

On sait cependant aujourd'hui que la MVTE résulte d'une combinaison de facteurs de risque congénitaux et acquis, parfois à faible risque de thrombose veineuse lorsqu'ils sont pris isolément, mais qui une fois cumulés ou associés, peuvent conduire sa constitution (18).

Mécanismes de la thrombose

La physiopathologie de la thrombose a été largement étudiée pour élucider au mieux l'équilibre complexe existants entre les facteurs de la coagulation, les plaquettes, les anticoagulants naturels et le système fibrinolytique (19). On décrit classiquement la thrombose comme résultante de la perte de cet équilibre au profit des acteurs pro-coagulants.

La cascade de la coagulation

Le schéma classique de la coagulation repose sur une enzyme clef, la thrombine, issue de deux voies de formation : la voie intrinsèque ou voie plasmatique et la voie extrinsèque ou voie du facteur tissulaire (20–22). La formation de thrombine permettra la transformation finale du fibrinogène en fibrine pour la formation d'un caillot de fibrine.

La voie intrinsèque correspond activation du facteur XI par le facteur XII, les kininogènes de haut poids moléculaire et les prékallikréines (**Figure 3**). Le facteur XIa permet alors l'activation du complexe tenase formé par les facteurs IXa et VIIIa qui activent le facteur X sur les phospholipides membranaires en présence de calcium. Le facteur Xa forme alors, avec le facteur Va et les phospholipides en présence de calcium, le complexe prothrombinase qui

convertit la prothrombine en thrombine. La thrombine peut amplifier sa propre formation par activation des facteurs V et VIII.

Dans la voie extrinsèque, résultant de la lésion vasculaire, le facteur tissulaire (glycoprotéine membranaire normalement exprimée à surface des cellules périvasculaires mais non exprimé par les cellules au contact direct avec le sang) forme un complexe avec le facteur VIIa qui active directement le complexe prothrombinase, permettant la génération de thrombine.

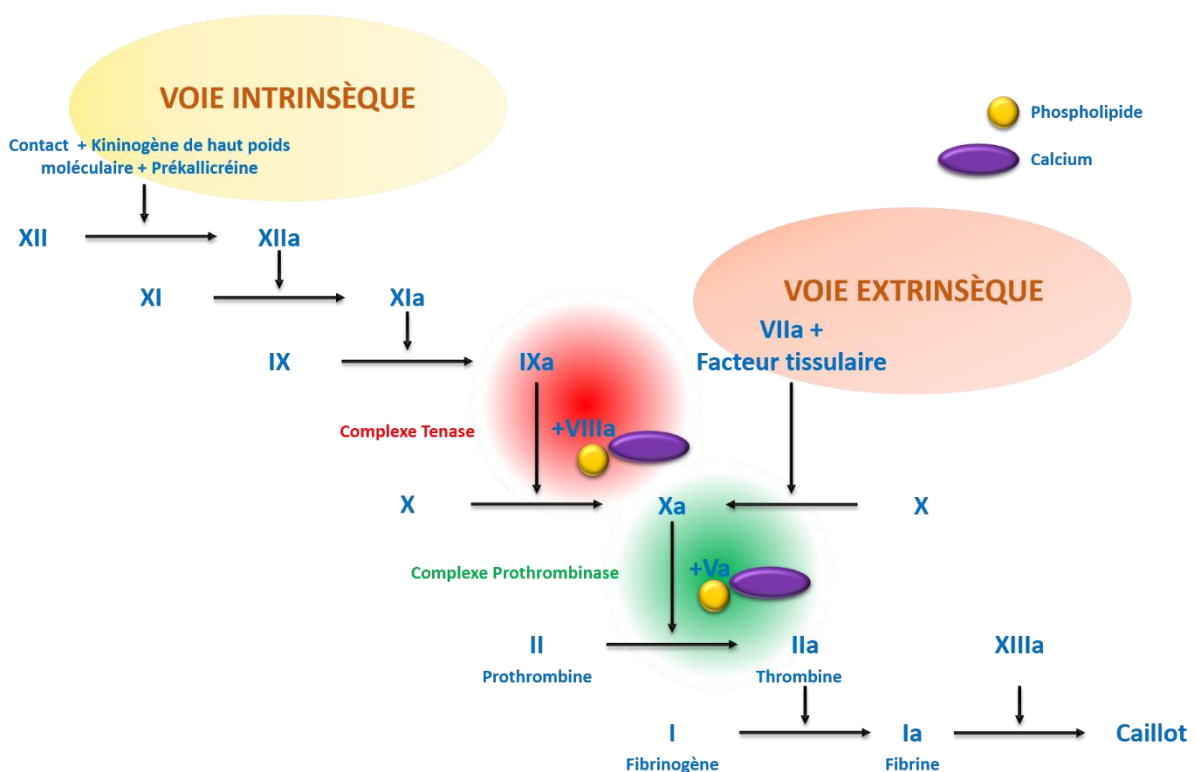


Figure 3 : schéma de la cascade de la coagulation

Ce système de coagulation est en équilibre avec des mécanismes régulateurs (**Figure 4**) (19). Schématiquement, la génération initiale de thrombine est régulée par l'inhibiteur de la voie extrinsèque, le *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI), qui inhibe le complexe facteur tissulaire – facteur VIIa en se fixant au facteur Xa.

Dans un deuxième temps, la thrombine permet l'activation de la protéine C en protéine C activée en présence de thrombomoduline. Cette protéine C activée va inhiber les facteurs Va et VIIIa en présence de protéine S.

L'antithrombine inhibe à la fois les facteurs IIa, Xa, IXa et XIa.

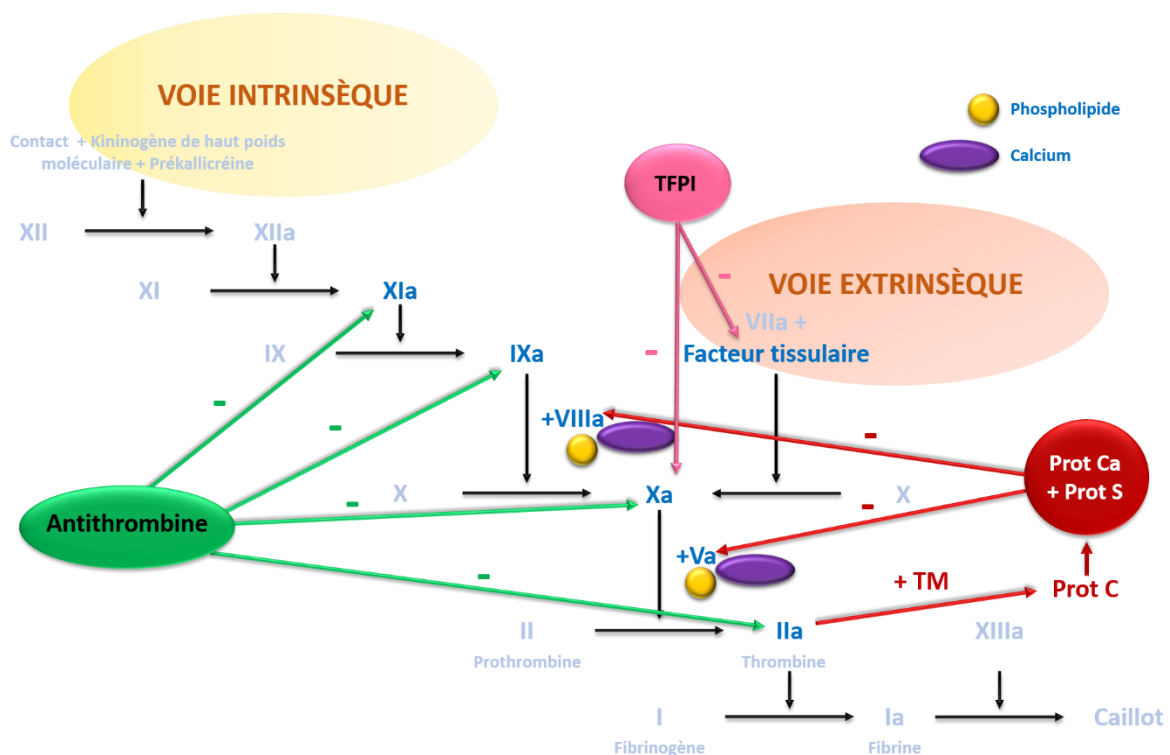


Figure 4 : les inhibiteurs physiologiques de la coagulation

Le système physiologique de la fibrinolyse est en équilibre avec celui de la coagulation. Le plasminogène, glycoprotéine circulante du plasma normal, va être activé en plasmine grâce à l'action d'activateurs plasmatiques ou tissulaires (tissue Plasminogen Activator ou t-PA et urokinase Activator Plasminogen u-PA). La plasmine va ainsi agir sur la fibrine, le fibrinogène, les facteurs V et VIII de la coagulation, pour lyser le caillot de fibrine et former les produits de dégradation de la fibrine (les D-Dimères) et du fibrinogène.

Des inhibiteurs de la fibrinolyse limitent ce phénomène (l'inhibiteur des activateurs du plasminogène ou PAI-1, l'HRGP [Histidin Rich Glycoprotein] qui inhibe le plasminogène et l'anti C1-estérase qui inhibe la voie contact). Les inhibiteurs de la plasmine sont l' α 2-antiplasmine (α 2-AP) et l' α 2-macroglobuline (α 2-MG) (Figure 5).

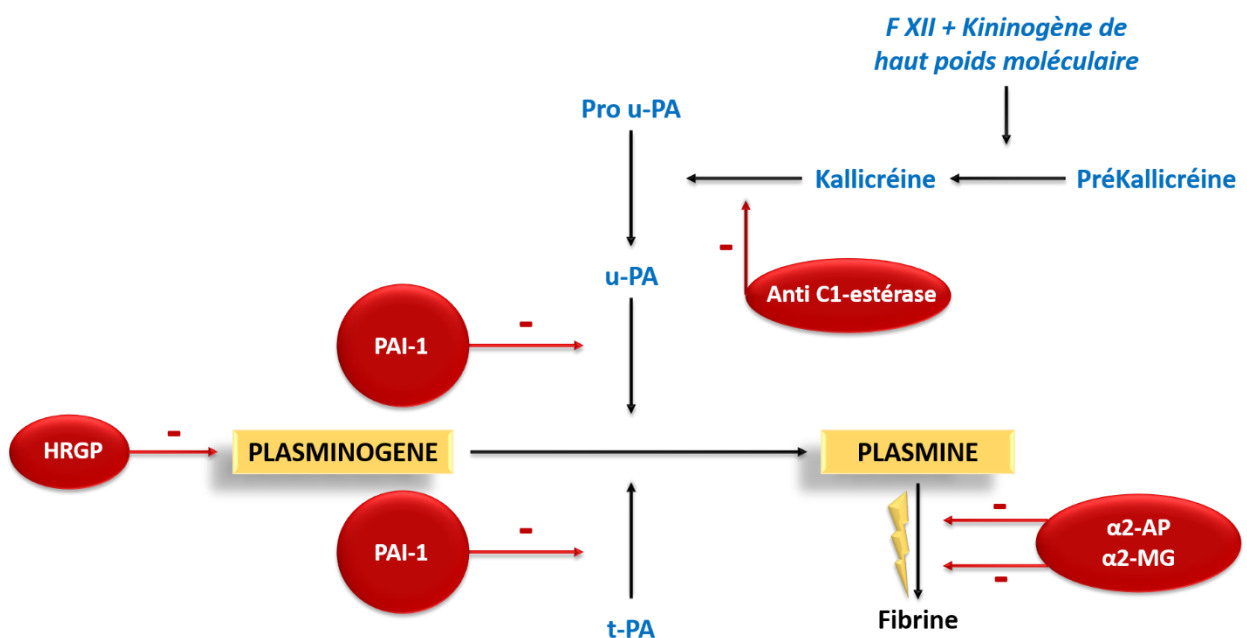


Figure 5 : le système de la fibrinolyse

Les acteurs de la coagulation et de la formation du thrombus

La thrombose survient de manière physiologique en cas de lésion de la paroi vasculaire, d'une dysfonction endothéliale ou d'une rupture de plaque d'athérome dans le système artériel. Le facteur tissulaire ainsi exposé du sous-endothélium peut se lier au facteur VII/VIIa circulant avec une haute affinité, permettant ainsi localement le clivage des facteurs IX et X pour initier la génération de thrombine (23). Cette petite quantité de thrombine générée aura plusieurs fonctions, dont l'une est l'activation des plaquettes situées à proximité du site lésionnel qui exposera alors les récepteurs et les sites de liaison pour les facteurs de coagulation activés (**Figure 6A**). La thrombine activera les facteurs V et VIII à la surface de la plaquette activée (24). Dans le même temps, la dissociation du complexe facteur VIII/facteur Von Willebrand permet au facteur Von Willebrand de réaliser un pont entre le collagène sous endothélial et le récepteur GpIb pour permettre l'adhésion plaquettaire (25). Après l'adhésion plaquettaire, le phénomène de dégranulation a lieu avec sécrétion des granules α et des granules denses δ , qui contiennent entre autre du calcium se liant aux phospholipides membranaires pour les complexes nécessaires à la cascade de la coagulation (22). La surface plaquettaire coordonne l'activité des complexes tenases et prothrombinases pour la propagation et l'amplification de la cascade de coagulation. L'aggrégation plaquettaire et l'amplification de ce phénomène sont permis grâce à l'activation plaquettaire *via* la production de thromboxane A₂ (TXA₂). Le TXA₂ va élargir l'agrégat plaquettaire à l'aide d'ADP pour la formation du clou plaquettaire et permettre le dépôt du fibrinogène à la surface des plaquettes par l'induction de la modification conformationnelle des récepteurs GPIIb/IIIa. La thrombine permettra la conversion de ce fibrinogène en fibrine pour la stabilité du clou plaquettaire (**Figure 6B**). Au niveau endoluminal, la balance entre la prostacycline (PGI₂) et le TXA₂ va permettre de

circonscire le développement du thrombus au site lésionnel (26). Le contrôle de l'amplification du phénomène thrombotique est également permis lorsque la thrombine générée par la lésion atteint l'endothélium sain adjacent. La thrombine va se lier à la thrombomoduline activant ainsi la protéine C, qui se lie à son cofacteur la protéine S pour inactiver les facteurs Va et VIIIa. Cette inactivation a cependant préférentiellement lieu à la surface endothéliale plutôt qu'à la surface plaquettaire, ce qui permet de délimiter une zone de formation du thrombus (27,28).

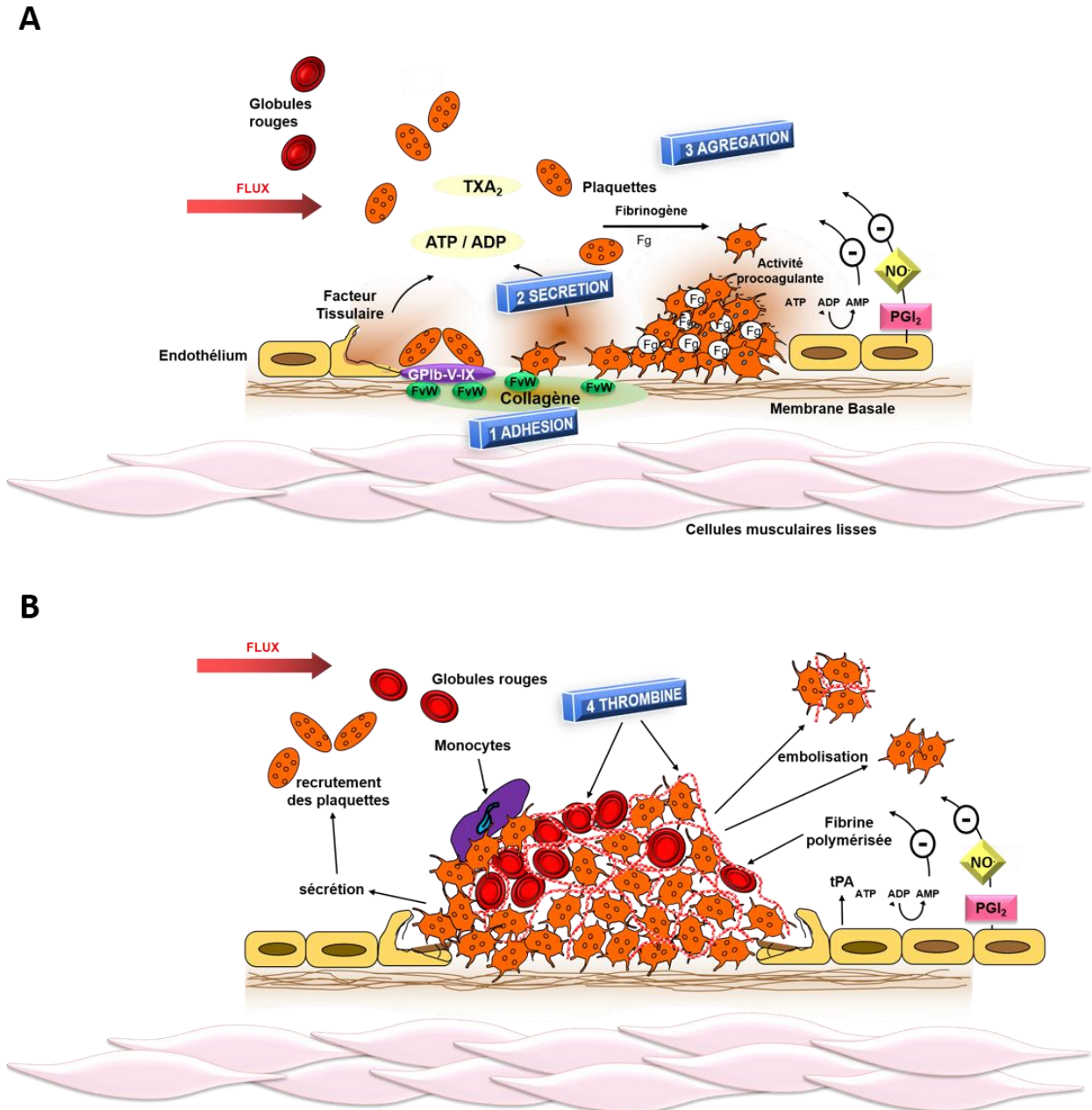


Figure 6 : Les acteurs de la thrombose artérielle après une lésion endothéliale. A. Initiation de la thrombose après la lésion : adhésion plaquettaire, activation, sécrétion et agrégation. B. Amplification de l'agrégation plaquettaire, génération de thrombine et formation de fibrine pour la stabilisation du clou plaquettaire.

Depuis peu, on attribue également aux érythrocytes un rôle dans la formation de la thrombose, à la fois dans l'artère mais aussi dans la veine (29). Dans l'artère, les érythrocytes favorisent l'adhésion ainsi que l'activation plaquettaire et augmentent les interactions plaquettes-thrombus (**Figure 7A**). La viscosité sanguine locale est peu augmentée sous l'effet du flux rapide dans l'artère et des importantes forces de cisaillement. Dans la veine au contraire, où la stase sanguine est importante, les globules rouges s'agrègent en rouleaux (en « piles d'assiettes »), augmentant ainsi la viscosité du sang (**Figure 7B**). Ces érythrocytes augmentent la taille du thrombus, réduisent la perméabilité du thrombus en cours de formation à la lyse physiologique et contribuent à la génération de thrombine au sein du thrombus. Ainsi, les globules rouges pourraient avoir un effet prédominant dans la constitution du thrombus dans la veine par rapport à l'artère (29).

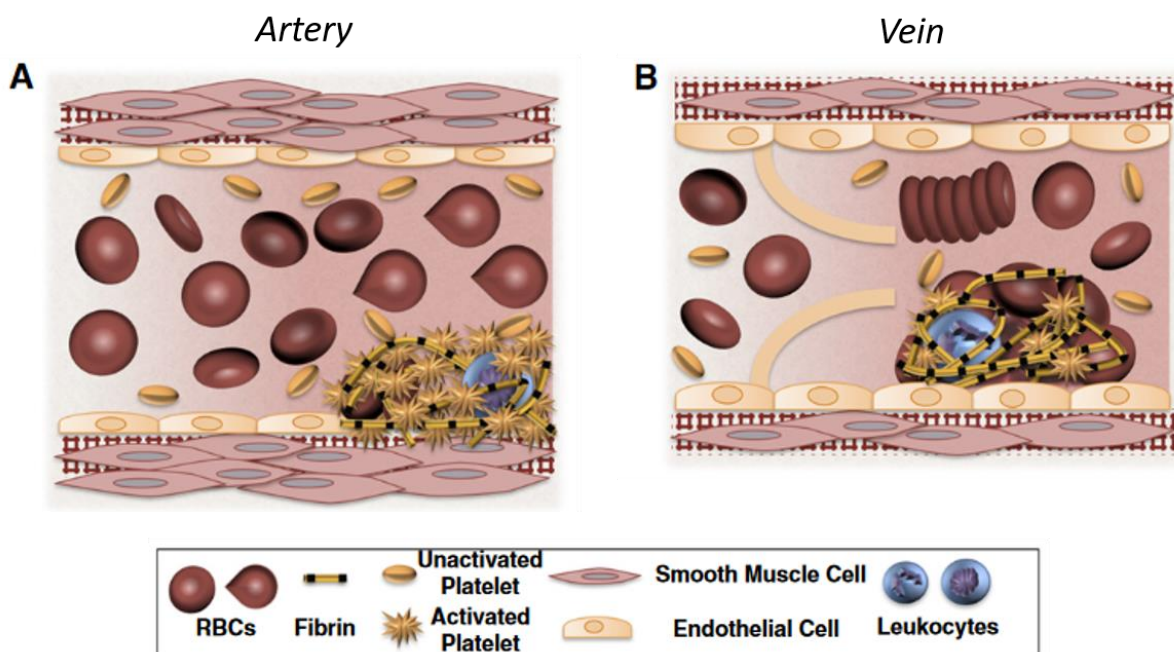


Figure 7 : Place des érythrocytes dans la thrombose. A. implication des érythrocytes dans la formation du thrombus artériel. B. Implication des érythrocytes dans la formation du thrombus veineux (de Byrnes et Wolberg, *Blood*. 2017 (29))

Facteurs de risque cardiovasculaires d'athérosclérose et risque de thrombose veineuse

Depuis environ dix ans, plusieurs études épidémiologiques ont montré une association entre les FRCV majeurs d'athérosclérose (âge, hypertension artérielle, dyslipidémie, diabète et tabagisme actif) et la survenue d'une thrombose veineuse mais avec des résultats discordants (30–35). Une méta-analyse d'Agno et al. en 2008 a montré une association positive entre les FRCV majeurs d'athérosclérose et l'incidence de la MVTE (36). Cette méta-analyse a été remise en cause récemment du fait d'un non ajustement des paramètres étudiés à d'importants facteurs confondants comme l'âge ou l'indice de masse corporel (IMC). Elle aurait également inclus dans l'analyse des études de faible puissance (études cas-contrôles) ou des éléments non actualisés comme le caractère non provoqué ou provoqué de la MVTE ou des événements non validés dans le suivi des patients. Ainsi, Mahmoodi et al. ont publié en 2017 une méta-analyse basée sur les données individuelles des études prospectives où les FRCV ont été relevés et les événements validés (37). Leur méta-analyse conclue à l'absence d'association entre les FRCV modifiables et l'augmentation du risque de MVTE, en dehors d'une association entre le tabagisme actif et la MVTE provoquée. Selon les auteurs, les associations positives des études antérieures provenaient du fait qu'elles ne tenaient pas compte de facteurs confondants.

Nous devons également mettre en avant que ces méta-analyses recherchaient le lien individuel de chaque FRCV et le risque de MVTE, mais qu'ils n'ont pas cherché à évaluer le poids de l'accumulation des FRCV sur le risque de MVTE. Tout comme les facteurs de risque de thrombose veineuse, peut-être que chaque FRCV pris individuellement ait un impact modéré sur le risque de thrombose veineuse mais que leur association constituerait un risque

suffisamment puissant pour provoquer une thrombose veineuse. Nous rejoignons ainsi les résultats des études montrant un lien entre le syndrome métabolique (obésité, hypertension artérielle, dyslipidémie et intolérance aux glucides) et le sur risque de thrombose veineuse (30,38,39). Une réponse à l'ensemble de ces résultats contradictoires pour une problématique complexe, serait de mettre en place une étude prospective dont l'objectif principal serait de démontrer l'association ou non des FRCV et le risque de MVTE, qu'ils soient alors individuels ou intégrés dans le syndrome métabolique. On ne montrerait cependant qu'un lien épidémiologique, sans pouvoir expliquer les mécanismes sous-jacents. Ces études épidémiologiques devraient être étayées par des travaux issus de la recherche fondamentale démontrant les répercussions des FRCV sur le système veineux et la genèse de la thrombose veineuse. L'hypothèse à développer serait de savoir s'il existe une répercussion des FRCV sur l'endothélium veineux, de manière similaire à ce qu'il se produit dans l'artère.

Fonction endothéliale

Le système vasculaire permet au sang circulant d'assurer la croissance, le développement et la fonction de toutes les cellules de l'organisme en permettant l'absorption de l'oxygène, des nutriments mais aussi en assurant l'élimination des déchets cellulaires et métabolique (40).

L'endothélium, monocouche cellulaire tapissant l'ensemble de la face interne des vaisseaux (**Figure 8**), ne joue pas seulement le rôle de barrière entre le sang circulant et le tissu environnant. Depuis les travaux de Furchgott et Zawadzki (41), l'endothélium n'est plus vue comme une simple barrière, mais comme un organe à part entière, complexe, interactif, permettant d'assurer l'ensemble des fonctions vasculaires. L'atteinte de l'endothélium est le

primum movens des pathologies cardiovasculaires, thrombotiques, athéroscléreuses et athéro-thrombotiques (42).

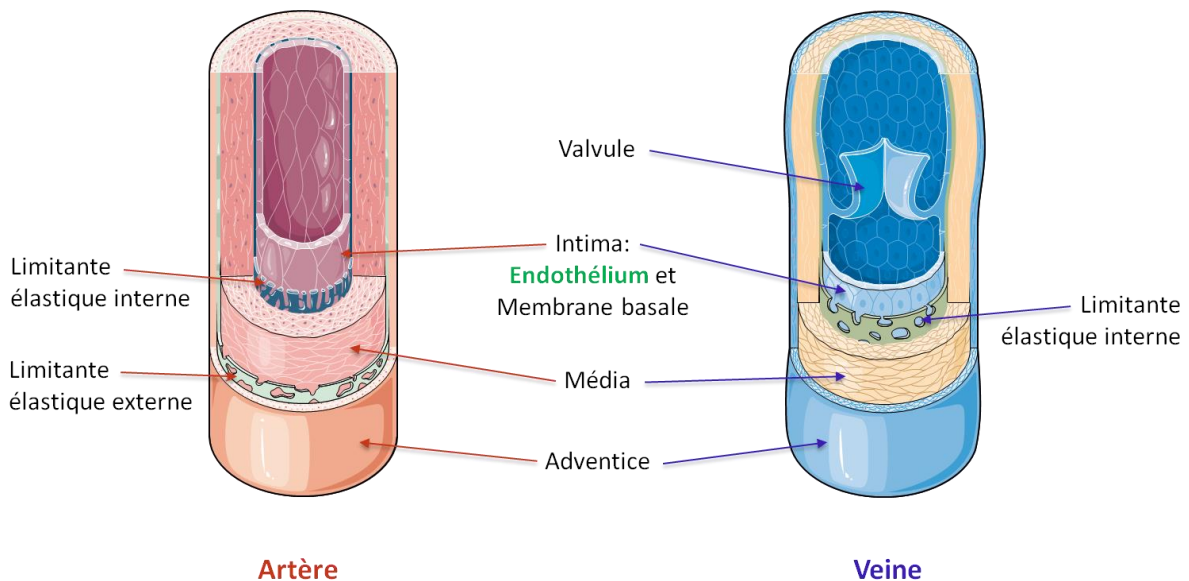


Figure 8 : Structure de la paroi artérielle et veineuse (Servier Medical Art[®]) : l'endothélium repose sur une membrane basale, constituant l'intima, couche la plus interne de la paroi vasculaire. Elle est séparée de la couche la plus externe, l'adventice, par la média, constituée principalement de couches de cellules musculaires lisses et plus importante dans l'artère que dans la veine. L'artère comprend également 2 structures élastiques, les limitantes élastiques interne et externe, alors que la veine n'en comprend qu'une. Contrairement à l'artère, la veine présente la particularité de posséder des valvules, empêchant le retour du sang circulant.

Rôle de la régulation de la vasomotricité

Furchgott et Zawadzki ont pour la première fois montré en 1980 que l'absence d'endothélium sur une aorte de lapin empêchait sa relaxation médiée par l'acétylcholine (41). Cette découverte majeure a été suivie de nombreux travaux démontrant le rôle primordial de

l'endothélium dans la vaso-réactivité, en synthétisant des substances vasodilatatrices mais aussi vasoconstrictrices.

Vasodilatation

Les cellules endothéliales (CE) qui constituent l'endothélium permettent une vasodilatation ou relaxation en libérant des facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium (EDRF). Il s'agit du monoxyde d'azote (NO), du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) et de la prostacycline ou PGI₂.

Le monoxyde d'azote

Le NO est un gaz diffusible lipophile, possédant un radical libre lui conférant ainsi certaines propriétés chimiques spécifiques et lui permettant une interaction avec différentes cibles biologiques. Le NO est produit par la conversion enzymatique de la L-arginine par la NO Synthase endothéliale ou de type III (eNOS) (43). Les NOS sont présentes sous 3 formes chez les mammifères : la nNOS ou NOS neuronal, la iNOS ou NOS inducible et la eNOS ou NOS endothéliale.

Les NOS sont synthétisées sous forme de monomères (**Figure 9**). Chaque monomère comprend un domaine réductase et un domaine oxygénase. Les monomères avec un domaine C-terminal réductase isolés transfèrent les électrons de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) (qui est un cofacteur utilisé dans les catalyses effectuées par des oxydoréductases) à la flavine adénine dinucléotide (FAD) puis à la flavine mononucléotide

(FMN) (44). Ces monomères ont une faible capacité à réduire l'oxygène en anion superoxyde. Les monomères et les domaines de réductase isolés peuvent lier la calmoduline (le complexe calcium-calmoduline permettant l'activation des protéines par changement de conformation), ce qui permet le transfert d'électrons dans le domaine de la réductase. Les monomères ne peuvent cependant pas lier le cofacteur (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH4) ou la L-arginine, ce qui ne permet pas la catalyse pour la production de NO. La présence de l'hème permet la dimérisation des NOS pour la formation de dimères actifs en liant le domaine C-terminal réductase d'un monomère au domaine N-terminal oxygénase d'un autre monomère. L'hème permet également le transfert d'électrons interdomaines des flavines à l'hème du monomère opposé. Ainsi, les capacités d'oxydation de la NADPH sont fortement améliorées dans les dimères de NOS contenant des hèmes et dépourvus de substrat. En présence de L-arginine et de BH4, les dimères de NOS couplent leurs hèmes et la réduction de l'oxygène pour la synthèse de NO, avec formation de L-citrulline comme sous-produit (45).

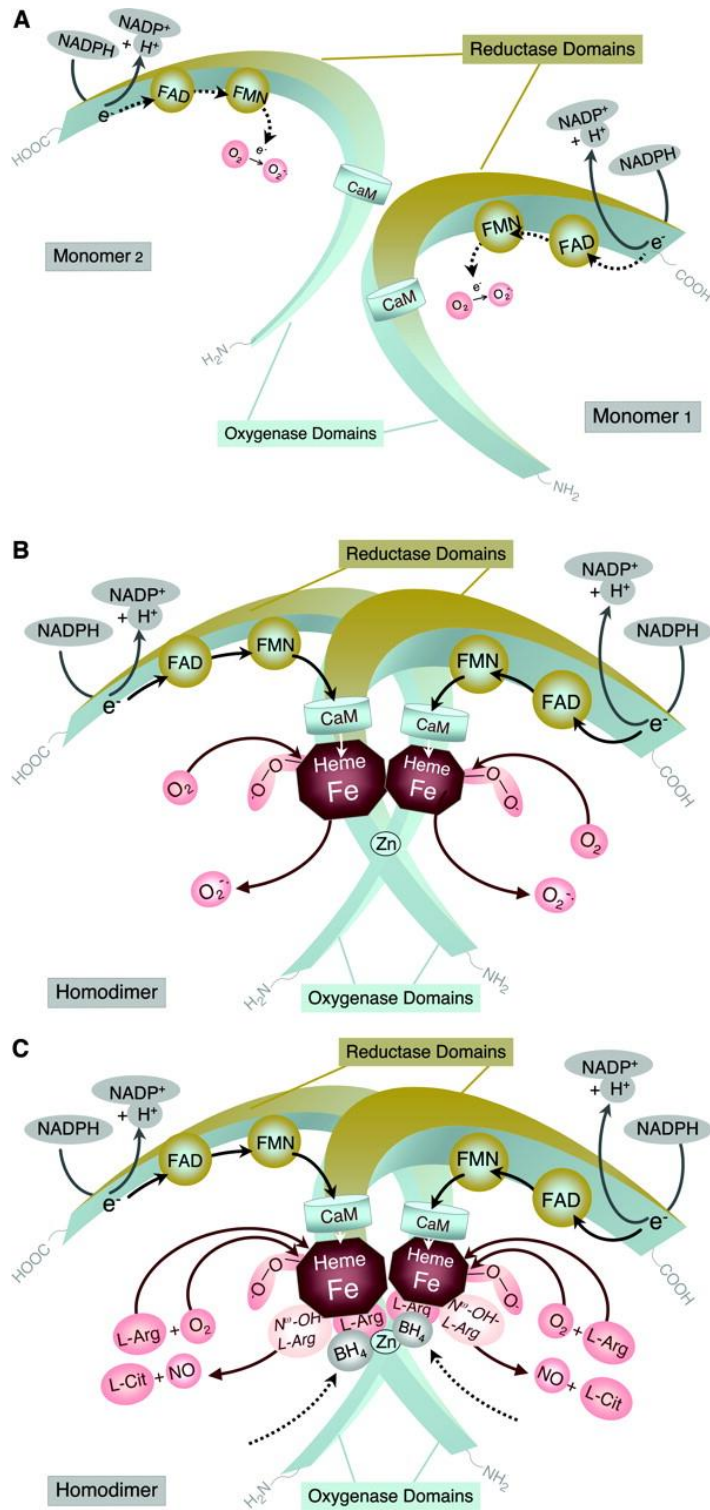


Figure 9 : Structure de la NO synthase et de sa catalyse. Illustration de Förstermann et Münzel 2006 (45). **A :** Monomères de NOS avec faible capacité à réduire l’oxygène en anion superoxyde. **B :** la présence de l’hème contenant un atome de fer permet la dimérisation des monomères de NOS en homodimère. **C :** en présence de L-arginine et de BH₄, les dimères de NOS couplent leurs hèmes et la réduction de l’oxygène pour la synthèse de NO, avec formation de L-citrulline.

Pour produire du NO, la eNOS doit être activée. L'activation de la eNOS peut être soit calcium-dépendante soit calcium-indépendante (**Figure 10**) (46). Certains agonistes comme les neurotransmetteurs (acétylcholine, noradrénaline), des autacoïdes (bradykinine, endothéline-1, ADP/ATP), des facteurs dérivés des plaquettes (thrombine, sérotonine, ADP) et l'histamine vont se lier à leurs récepteurs spécifiques au niveau de la membrane cellulaire endothéliale pour permettre l'augmentation intracellulaire de calcium. Ce calcium va se lier à la calmoduline pour permettre l'activation de la eNOS au niveau de son site de liaison à la calmoduline pour permettre la production de NO. La voie calcium-indépendante est liée à la phosphorylation de la eNOS. Les agents physiques comme le shear stress ou les facteurs hormonaux (catécholamines, angiotensine II, insuline, oestrogènes) ou les facteurs de croissance vont induire une phosphorylation des protéines kinases Akt et PKA, qui vont activer la eNOS en phosphorylant les sites Ser635 ou Ser1179 et souvent mener l'activation de la eNOS en déphosphorylant le site Thr495 (46,47).

En présence de niveaux sub-saturants de BH4, le transfert d'électrons dans eNOS devient découplé de l'oxydation de la L-arginine et de la formation de NO. Ce désaccouplement entraîne une production d'anions superoxydes par eNOS. Lorsque la biodisponibilité de BH4 ou de L-arginine diminue, le dimère eNOS présente un domaine oxydase moins « serré » et une plus grande sensibilité à la protéolyse.

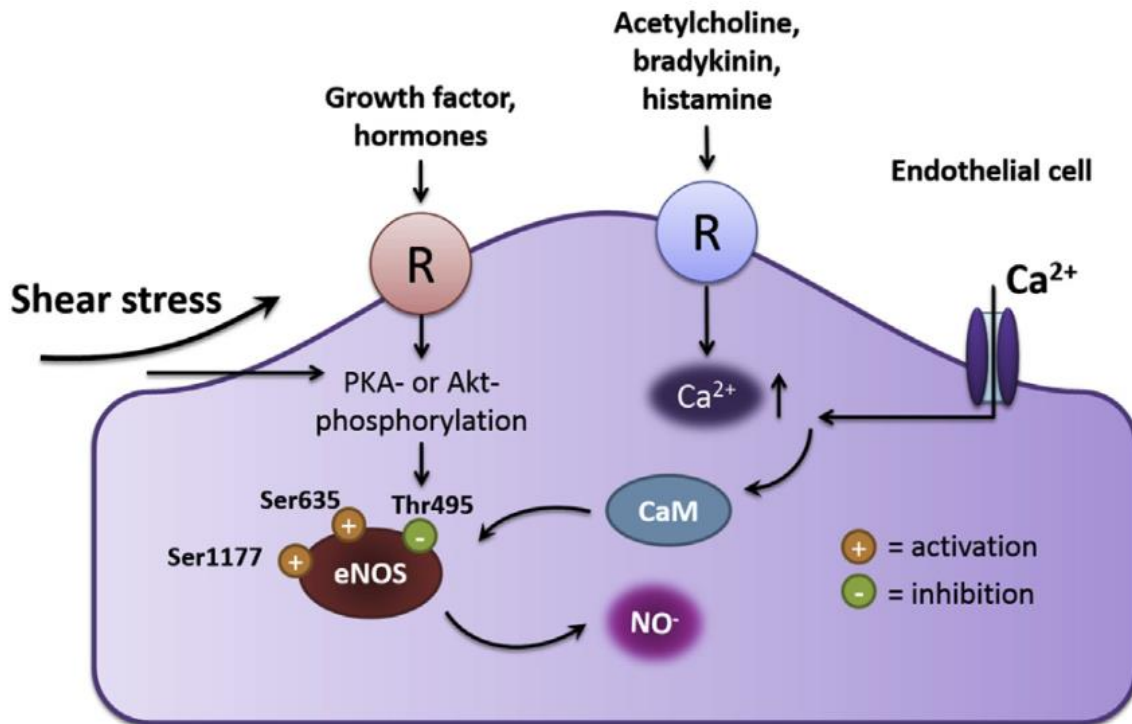


Figure 10 : Voies d'activation de la eNOS d'après Zhao et al. 2015 (46). R= récepteur, CaM=Calmoduline, Ca²⁺=calcium.

Une fois le NO produit, celui-ci va diffuser au sein de la paroi vasculaire vers les cellules musculaires lisses de la média. Le NO va stimuler la guanylate cyclase soluble au sein de la cellule musculaire lisse pour induire la formation de guanosine 3', 5' cyclique monophosphate (cGMP). Le cGMP va activer la protéine kinase G qui favorise la recapture du calcium cytosolique dans le réticulum sarcoplasmique, l'expulsion du calcium hors de la cellule et l'ouverture des canaux potassiques calcium-dépendant (Figure 11) (43,46). Les concentrations intracytoplasmiques de calcium vont diminuer ce qui va entraîner une diminution de phosphorylation de la myosine par la MLCK (myosin light chain kinase) et une augmentation de l'activité de la MLCP (myosin light chain phosphatase) et une diminution des liaisons actine-myosine pour induire la relaxation. Le NO est un puissant vasodilatateur.

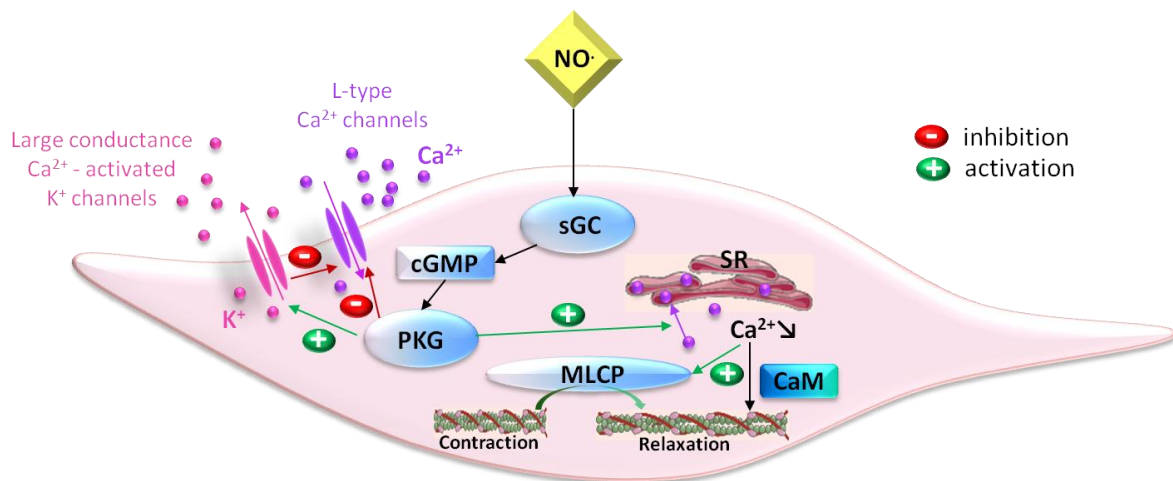


Figure 11 : Effets du NO dans la cellule musculaire lisse. D'après Vanhoutte et al. 2016 (48). sGC=guanylate cyclase soluble, cGMP=guanosine monophosphate cyclique, PKG=protéine kinase G, MLCP=myosin light chain phosphatase, CaM=calmoduline, Ca²⁺=calcium, K⁺=potassium, SR= réticulum sarcoplasmique.

Prostaglandine I₂ ou Prostacycline

Le NO n'est pas le seul facteur vasodilatateur dérivé de l'endothélium (49). La prostaglandine I₂ (PGI₂) ou prostacycline en est un autre. La PGI₂ est un prostanoloïde appartenant à la grande famille des eicosanoïdes. Les eicosanoïdes sont des médiateurs lipidiques issus de l'hydrolyse des phospholipides membranaires par la phospholipase A₂ (PLA₂) en libérant de l'acide arachidonique (AA) qui en est la molécule centrale. L'AA est métabolisé par les cyclooxygénases (COX) 1 et 2 en prostaglandine G₂ (PGG₂). La PGG₂ est elle-même dégradée par une peroxydase en prostaglandine H₂ (PGH₂). La PGH₂ va être métabolisée en différents prostanoloïdes selon l'action de différentes synthases. Ainsi, la prostaglandine synthase I catalyse la PGH₂ en PGI₂ (50,51).

La PGI₂ ainsi produite près de la membrane plasmique peut directement diffuser ou être transportée vers le milieu extracellulaire pour agir localement de manière autocrine ou

paracrine, en stimulant son récepteur IP à 7 domaines transmembranaires couplé à l'adénylate cyclase ou à la phospholipase C via des protéines G. La stimulation de l'adénylate cyclase va induire la formation de l'adénosine 3',5' cyclique monophosphate (AMPc) qui va à son tour activer la protéine kinase A. L'activation de la protéine kinase A va entraîner une diminution de la concentration cytosolique de calcium et provoquer une inhibition de la Rho kinase (qui contrôle l'assemblage des filaments d'actine du cytosquelette et la contraction des cellules musculaires lisses), entraînant ainsi une vasodilatation (**Figure 12**).

Parallèlement, la PGI₂ produite à proximité de la membrane nucléaire a directement accès au récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) (52). Le PPAR est une protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires liant naturellement les lipides et agissant comme facteur de transcription des gènes cibles impliqués dans ce cas destinés à l'implantation embryonnaire et la différenciation adipocytaire en synergie avec l'activation des récepteurs IP.

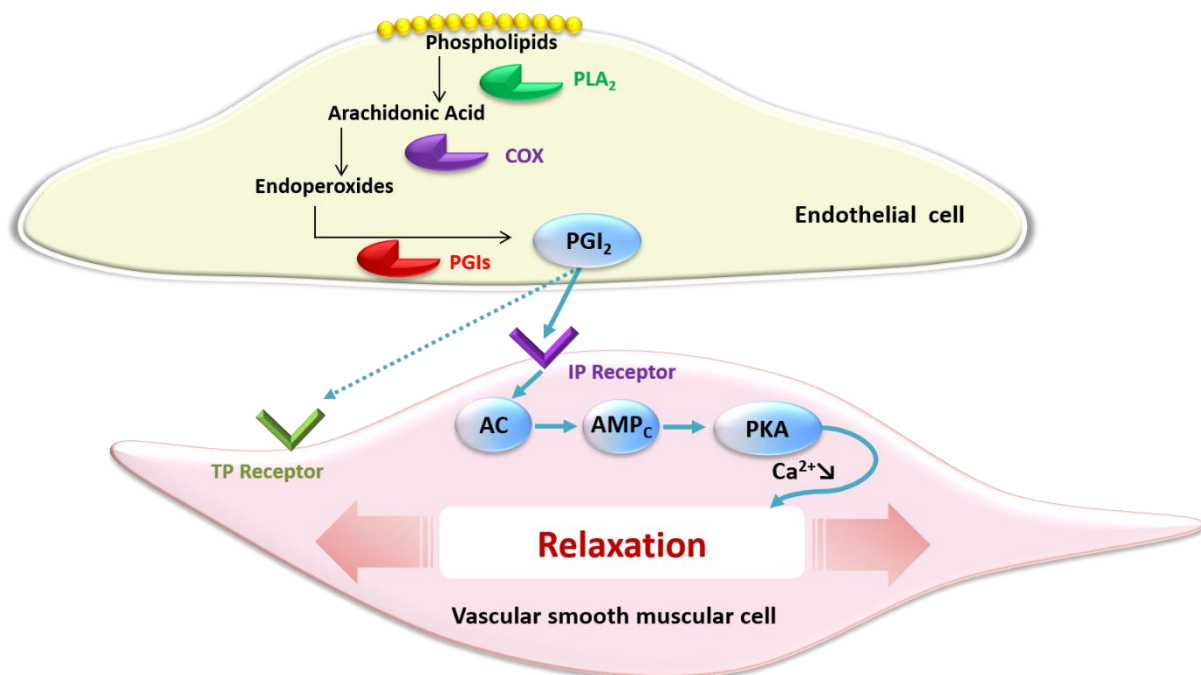


Figure 12 : Relaxation musculaire lisse induite par la prostacycline (PGI₂). PLA₂= Phospholipase A₂, COX= cyclo-oxygénases, PGIs = Prostaglandine I₂ synthase, AC=adenylate cyclase, AMP_c=guanosine monophosphate cyclique, PKA=protéine kinase A, Ca²⁺=calcium.

Dans certains cas, la prostacycline apparait être au contraire un important facteur vasoconstricteur dérivé de l'endothélium, en particulier en conditions pathologiques, sous l'influence des FRCV d'athérosclérose, à savoir l'âge, l'obésité, le diabète ou l'hypertension (53). A cet effet, l'endothéline-1, un puissant vasoconstricteur, peut potentialiser son effet délétère en augmentant la production de prostacycline. La prostacycline joue ainsi un double jeu, à la fois protecteur et néfaste sous certaines conditions et dans certains territoires vasculaires artériels (effet vasoconstricteur par exemple sur l'aorte et l'artère mésentérique supérieure dans des modèles murins, mais peu d'effet sur l'artère coronaire de porc)(54).

Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

Lorsque la synthèse de NO et de PGI₂ sont inhibées par des bloqueurs de la eNOS et des COX, il persiste une vasodilatation endothélium-dépendante par l'acétylcholine ou la bradykinine, associée à une hyperpolarisation de la membrane de la cellule musculaire lisse. Elle est attribuée à l'hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (EDH). Cette composante n'est pas ubiquitaire puisqu'on estime que le tonus vasculaire lié à EDH est prédominant dans les artères dites de résistance plutôt que les artères de conductance.

Contrairement au NO ou à la PGI₂, l'EDH n'est pas un composant chimique unique mais tout un ensemble de facteurs endothéliaux pouvant induire une hyperpolarisation de la membrane cellulaire musculaire lisse. Malgré leur différence structurelle, ces EDH ont la capacité d'activer des canaux potassiques calcium-dépendant, de faible conductance (SK_{Ca}), de conductance intermédiaire (IK_{Ca}) et de grande conductance (BK_{Ca}) endothéliaux. Ces canaux potassiques sont activés par le calcium, entraînant une fuite potassique vers le milieu extra-cellulaire, induisant une hyperpolarisation. Cette hyperpolarisation va se transmettre le long de la paroi

vasculaire vers les cellules musculaires lisses et les cellules musculaires lisses entre elles, via les gap-junctions (**Figure 13**). Le mécanisme de la relaxation musculaire lisse qui en découle est mal connu mais une partie est expliquée par l'inhibition de l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants secondaires à l'hyperpolarisation, conduisant ainsi à la relaxation (55).

Les 6 principaux mécanismes expliquant l'EDH sont représentés par (56,57):

- **L'ion potassium** : l'hyperpolarisation est induite par la sortie d'ions potassiums de la cellule endothéliale via des canaux potassiques calcium-dépendants
- **Les acides epoxyeicosatrienoïques (EETs)** : en activant les canaux potassiques BK_{Ca} mais aussi en activant certains canaux calciques de la cellule musculaire lisse
- **Les métabolites de la 15-lipoxygénase-1** : 15-H-11,12-EETA et 11,12,15-THETA : en activant les canaux potassiques BK_{Ca}
- **Le peptide natriurétique de type C** : qui provoque une relaxation, une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses artérielles et veineuses et une ouverture des canaux potassiques BK_{Ca}
- La transmission électrique de l'hyperpolarisation endothéliale par **les gap-junctions myo-endothéliales**.
- **Le peroxyde d'hydrogène** : qui possède à la fois des propriétés constrictrices ou dilatatrices selon les tissus étudiés, en hyperpolarisant ou dépolarisant les cellules musculaires lisses.

Chez l'homme, nous ne savons pas si l'EDH concerne l'ensemble des territoires vasculaires et son rôle physiologique dans la circulation sanguine (58). Des travaux restent à mener pour

savoir si EDH pourrait être une cible potentielle pour les thérapeutiques à visée cardiovasculaire.

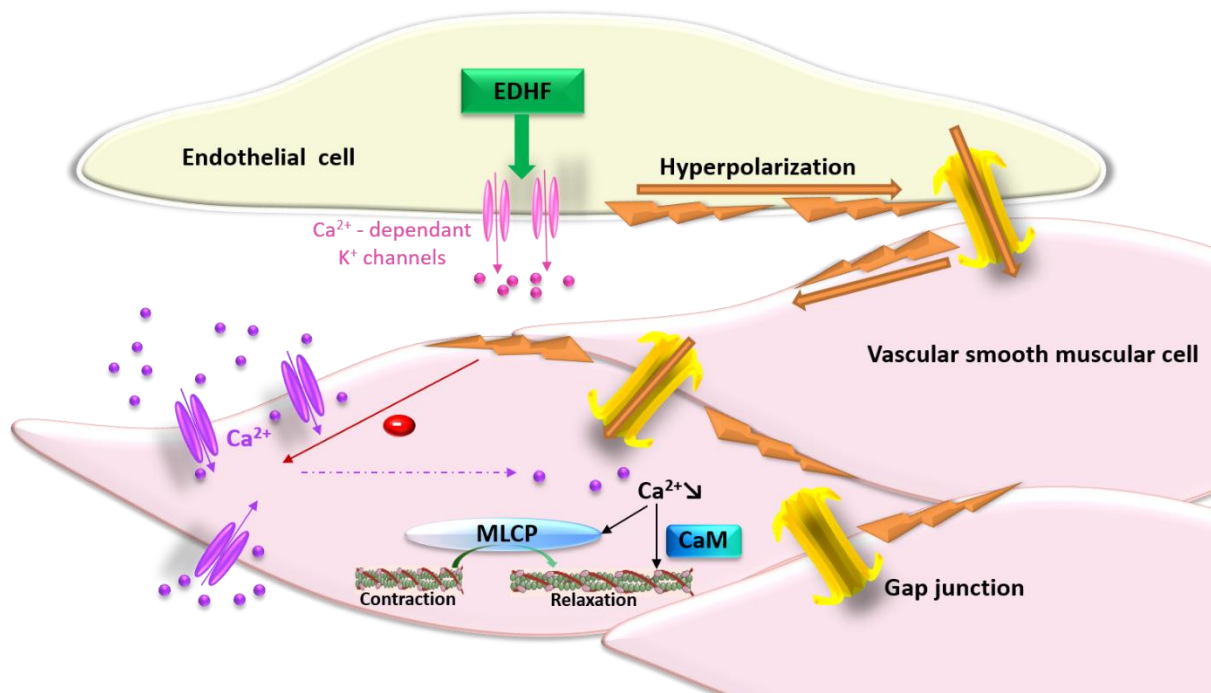


Figure 13 : Transmission de l'hyperpolarisation depuis la cellule endothéliale vers les cellules musculaires lisses après activation des canaux potassiques calcium dépendants par l'hyperpolarisation dérivée de l'endothélium, à travers les gap-junctions.

Vasoconstriction : Facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium

Certains facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF) sont observés dans l'endothélium sain, puisqu'ils ont un rôle physiologique dans la régulation de la vasoréactivité, en équilibre étroit avec les facteurs vasodilatateurs. Malheureusement, les EDCFs sont également associées aux maladies cardiovasculaires où leur excès de production contrebalance la dilatation de l'endothélium secondaire au NO et à l'EDH, contribuant ainsi à la dysfonction endothéliale.

Les EDCFs comprennent les prostanoides (comme le thromboxane A2 ou la PGH₂), l'endothéline 1 et les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (59) (Figure 14).

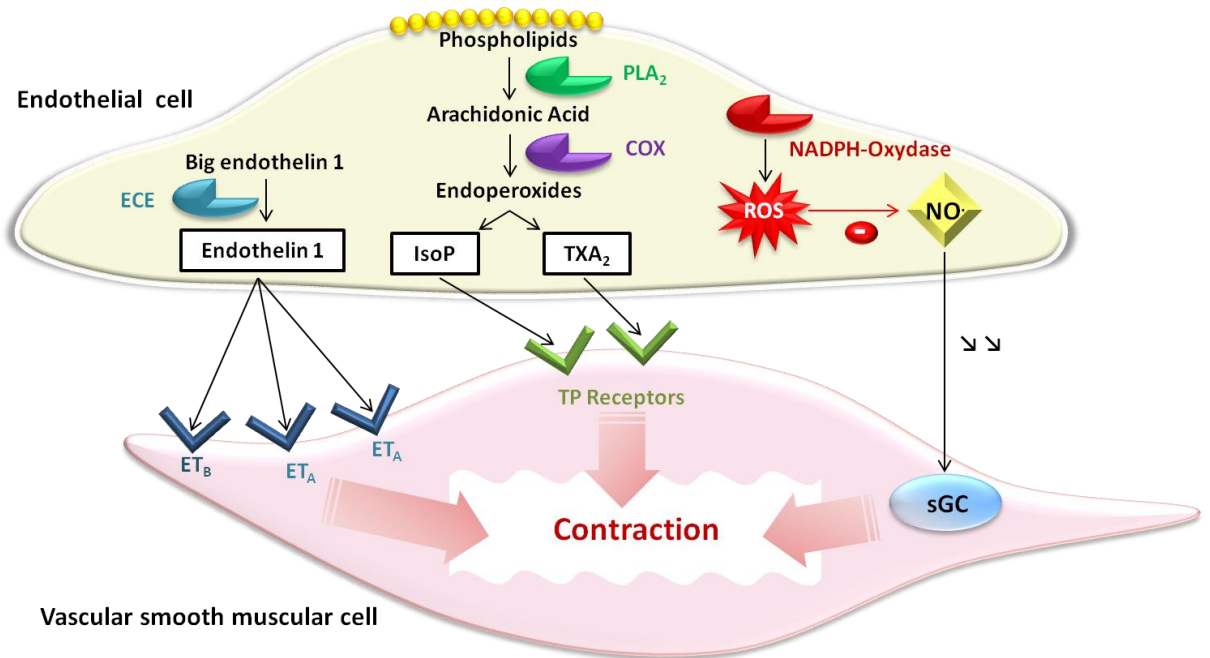


Figure 14 : Facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium. Les phospholipides membranaires sont métabolisés en acide arachidonique par la phospholipase A2 (PLA₂). Sous l'action des COX, l'acide arachidonique est métabolisé en endoperoxydes puis en isoprostanes (isoP) ou en thromboxane A2 (TXA₂). Ces prostanoides vont se lier aux récepteurs TP (Thromboxane/Prostaglandine) induisant une vasoconstriction, favorisée par une baisse de la voie du NO secondairement à l'action des espèces dérivées de l'oxygène (ROS) produits notamment par la NADPH-oxydase. L'endothéline 1 issue de la dégradation de la big endothéline 1 par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) va se lier sur ses récepteurs ET_A majoritaires ou ET_B minoritaires.

Prostanoïdes

Thromboxane A₂

Le Thromboxane A₂ (TXA₂) est un des métabolites de l'acide arachidonique issu de l'activité des COX. Le TXA₂ est généré principalement au niveau des plaquettes par la COX de type 1 (qui métabolise l'acide arachidonique en PGG₂ puis en PGH₂) et la thromboxane synthétase qui convertit la PGH₂ en TXA₂ (60). Le TXA₂ est un prostanoïde instable qui est rapidement métabolisé en divers produits : le thromboxane B₂ (TXB₂), le 2,3-dinor-thromboxane B₂ et le 11-déhydrothromboxane B₂, dépourvus d'activité biologique. Le TXA₂ pourra directement se lier à son récepteur, le récepteur TP (Thromboxane/Prostaglandine, couplé à une protéine G), pour exercer ses différentes fonctions biologiques. Le récepteur TP est retrouvé au niveau des plaquettes (variant TP α), des cellules musculaires lisses de la média, des cellules endothéliales (variant TP β) et des monocytes (61). Ainsi, le TXA₂ induit une activation plaquettaire, une prolifération des cellules musculaires lisses et une vasoconstriction, l'expression de molécules d'adhésion endothéliales et un chémoattractisme.

Les autres prostanoïdes

D'autres prostanoïdes que le TXA₂ sont capables d'agir comme des EDCFs comme la PGH₂, la PGF_{2 α} ou autres isoprostanés (62). Leurs actions biologiques EDCF-like sont également secondaires à leur liaison aux récepteurs TP. Les isoprostanés induisent une vasoconstriction de la plupart des vaisseaux et espèces étudiées, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cette activité vasoconstrictrice n'est pas spécifique des cellules musculaires lisses vasculaires mais elle est

également présente dans les lymphatiques, les cellules musculaires lisses gastro-intestinales, bronchiques ou utérines (63).

Endothéline 1

Les endothélines sont les plus puissantes molécules vasoconstrictrices de l'organisme et en comprennent 3 isoformes : les endothélines 1, 2 et 3 (64). Les endothélines se lient à deux types de récepteurs couplés aux protéines G : ET_A et ET_B . Les endothélines 1, 2 et 3 se lient avec la même affinité au récepteur ET_B alors que les endothélines 1 et 2 se lient avec une plus forte affinité que l'endothéline 3 au récepteur ET_A . L'endothéline 1 est l'isoforme la plus retrouvée dans le système cardio-vasculaire humain et est produite majoritairement par l'endothélium (elle peut également être produite par les cellules épithéliales pulmonaires ou rénales ou par des cellules inflammatoires comme les monocytes et les macrophages ou par certaines cellules neuronales). L'endothéline 1 résulte d'une synthèse complexe en plusieurs étapes : la pré-proendothéline 1, induite par la voie du $TGF\beta$, l'hypoxie, la thrombine ou le shear stress, est dégradée en pro-endothéline 1 ou big-endothéline 1 et finalement en endothéline 1 (65). Les cellules musculaires lisses des artères et des veines de gros calibres ainsi que les vaisseaux de faible résistivité présentent majoritairement des récepteurs ET_A et minoritairement les récepteurs ET_B . L'endothéline 1 participe ainsi à la régulation du tonus vasculaire pour la perfusion de l'ensemble des organes de l'organisme. Au-delà d'un puissant effet vasoconstricteur, l'activation des récepteurs ET_A a également la propriété d'induire la prolifération de certains types cellulaires, une inflammation ou une fibrose. Les récepteurs ET_B vont conduire à une vasodilatation par la libération de NO et de PGI_2 , permettant ainsi de contrebalancer les effets médiés par les récepteurs ET_A .

Dérivés réactifs de l'oxygène

Les ROS sont présents dans l'ensemble des organismes aérobies et sont caractérisées par leur réactivité chimique particulièrement élevée. Ils sont représentés par les radicaux libres comme l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle OH^{\cdot} , ainsi que les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Les ROS sont capables de moduler l'activité de molécules intracellulaires et des voies de signalisation induisant ainsi des modifications dans le phénotype de la cellule d'intérêt (voie de signalisation redox). Par ailleurs, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est capable d'interagir avec le NO pour former un autre radical libre, le peroxynitrite $ONOO^{\cdot-}$, ayant lui-même une activité biologique (66). Cette inactivation du NO est un des mécanismes clefs de la dysfonction endothéliale faisant le lit des maladies cardiovasculaires.

L' $O_2^{\cdot-}$ est majoritairement synthétisé par la NADPH oxydase dans le système cardiovasculaire. La NADPH oxydase est un complexe multiprotéique qui catalyse le transfert d'électrons depuis la NADPH vers une molécule d'oxygène qui est alors réduite en $O_2^{\cdot-}$:



L' $O_2^{\cdot-}$ est une molécule très instable, rapidement convertie par la superoxyde dismutase en H_2O_2 . L' H_2O_2 , plus stable, peut alors diffuser à travers les membranes cellulaires, interagir avec différents composés pour former des molécules délétères (il peut réagir avec des peroxydases, des composés halogénés ou hypohalogénés pour former des acides hypohalogénés ou pseudohypohalogénés ou en se transformant en radical hydroxyle en présence de fer ferreux [réaction de Fenton]) (67). Les ROS utilisent la voie de signalisation redox pour réguler la vaso-réactivité des cellules musculaires lisses vasculaires, en balance

avec le NO (68). En situation vasculaire pathologique, une production excessive de ROS submerge les mécanismes antioxydants de défense au niveau cellulaire, entraînant un stress oxydatif. La eNOS elle-même peut produire des anions superoxydes selon le processus de découplage de la eNOS, favorisé par la diminution de la biodisponibilité de BH4 et de la L-Arginine (69). Par ailleurs, les ROS issues des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales ont la propriété de traverser la paroi artérielle et de réagir avec les molécules de LDL-cholesterol pour produire des LDL-oxydés. Le LDL-oxydé est délétère pour la cellule endothéliale et responsable d'un chemotactisme induisant différents mécanismes de diapédèse leucocytaire pour la formation de cellules spumeuses et *in fine* de l'athérome (70).

Le rôle central de l'Acide Arachidonique et des Cyclo-Oxygénases

L'acide arachidonique est un acide gras 20 :4 (ω -6) polyinsaturé, présent dans les membranes cellulaires de l'organisme et présent dans les phospholipides. Les cellules endothéliales absorbent l'acide arachidonique issu de l'acide linoléique et l'incorporent dans la bicouche lipidique cellulaire et, lorsqu'elles sont stimulées de manière appropriée, le libèrent *via* la phospholipase A₂ et le métabolisent dans une variété de composés oxygénés appelés eicosanoïdes (71).

Dans la cellule endothéliale, l'acide arachidonique est principalement métabolisé par les COX (ou prostaglandines H Synthases) en prostaglandine G₂ (PGG₂) puis en prostaglandine H₂ (PGH₂). Les PGG₂ et PGH₂ seront à l'origine des prostaglandines E₂, F₂, et D₂ via les prostaglandines synthases, mais aussi de la prostacycline ou prostaglandine I₂ (PGI₂) via la

prostacycline synthase et des thromboxanes A₂ (TXA₂) dégradés en thromboxanes B₂ (TXB₂) via les thromboxane synthases. Les autres voies possibles de métabolisation passent par les lipo-oxygénases, aboutissant à la formation des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE), ou par une oxydation non enzymatique, aboutissant à la formation des isoprostanes (Figure 15).

Les COX sont présentes sous 3 types d'iso-enzymes :

- la COX-1 dite constitutive, présente au niveau de l'endothélium, de l'estomac, du rein et des plaquettes,
- la COX-2 dite inductible, localisée au niveau des fibroblastes, des macrophages, des chondrocytes, de l'utérus et de l'endothélium vasculaire suite à une réponse inflammatoire où elle va notamment permettre la synthèse de PGI₂,
- la COX-3, constitutive également, mais principalement localisée dans le cerveau (la COX-3 est codée par le même gène que COX-1, à la différence que COX-3 conserve un intron qui n'est pas retenu dans COX-1).

La cyclo-oxygénase de type I fut la première des cyclo-oxygénases découverte et fut longtemps considérée comme constitutive, alors que la COX-2 est considérée en général comme inductible, en particulier dans les phénomènes inflammatoires. Cependant, il a été montré que la COX-2 est également exprimée de manière constitutive dans certains tissus dont les cellules endothéliales, dont l'expression est modulée par le shear stress (72,73). En situation physiologique, les COX-1 et COX-2 mènent à la génération de divers prostanoides en équilibre entre les prostanoides vasodilatateurs et les prostanoides vasoconstricteurs, traduisant une fonction endothéliale saine. Cet équilibre est rompu par les facteurs de risque cardio-vasculaire, responsables d'une dysfonction endothéliale.

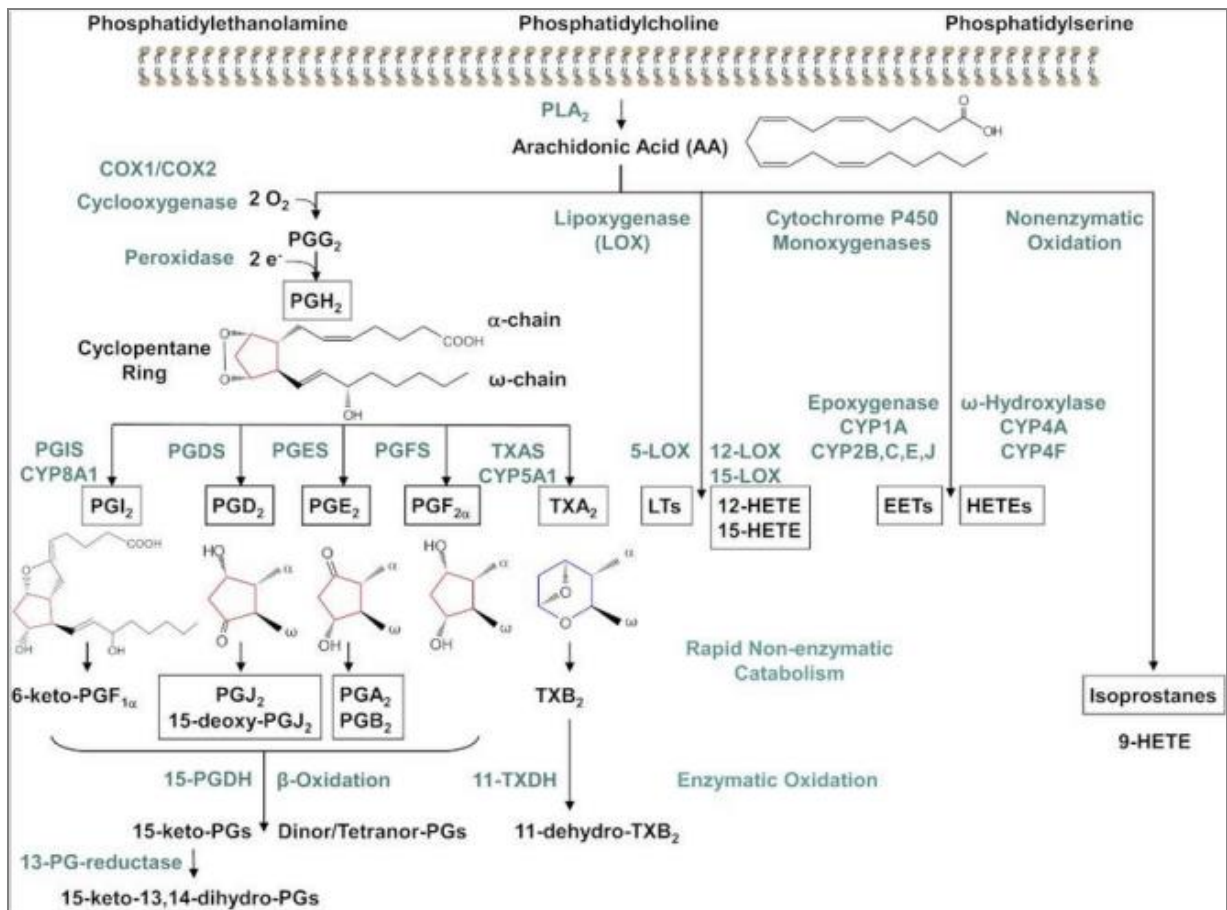


Figure 15 : Métabolisme et biosynthèse des eicosanoïdes et des prostanoides. D'après Majed et Khalil 2012 (51).

Dysfonction endothéliale et facteurs de risque cardiovasculaires

Dysfonction endothéliale artérielle

La dysfonction endothéliale correspond à un état pathologique de l'endothélium caractérisé par la perte de la balance entre les EDRFs et les EDCFs (74). Ce déséquilibre est associé à des modifications de la synthèse, de la biodisponibilité ou de l'action des facteurs issus de l'endothélium, ayant pour résultante une perte de la fonction protectrice endothélium dépendante et une augmentation des réponses contractiles aux agonistes vasoconstricteurs (**Figure 16**). Les facteurs de risque cardiovasculaires initient leur rôle pathologique sur le vaisseau artériel en induisant une dysfonction endothéliale faisant le lit des maladies cardiovasculaires et de l'athérosclérose et sont appelés facteurs de risques cardiovasculaires majeurs d'athérosclérose. Il s'agit de l'âge, de l'hypertension artérielle (HTA), du diabète, de l'obésité, de la dyslipidémie et du tabagisme. D'après la littérature, les mécanismes de la dysfonction endothéliale ne sont pas les mêmes selon le facteur de risque incriminé. Le cumul des facteurs de risque cardiovasculaires, comme dans le syndrome métabolique, pourrait alors démultiplier la dysfonction endothéliale par l'association de plusieurs voies délétères.

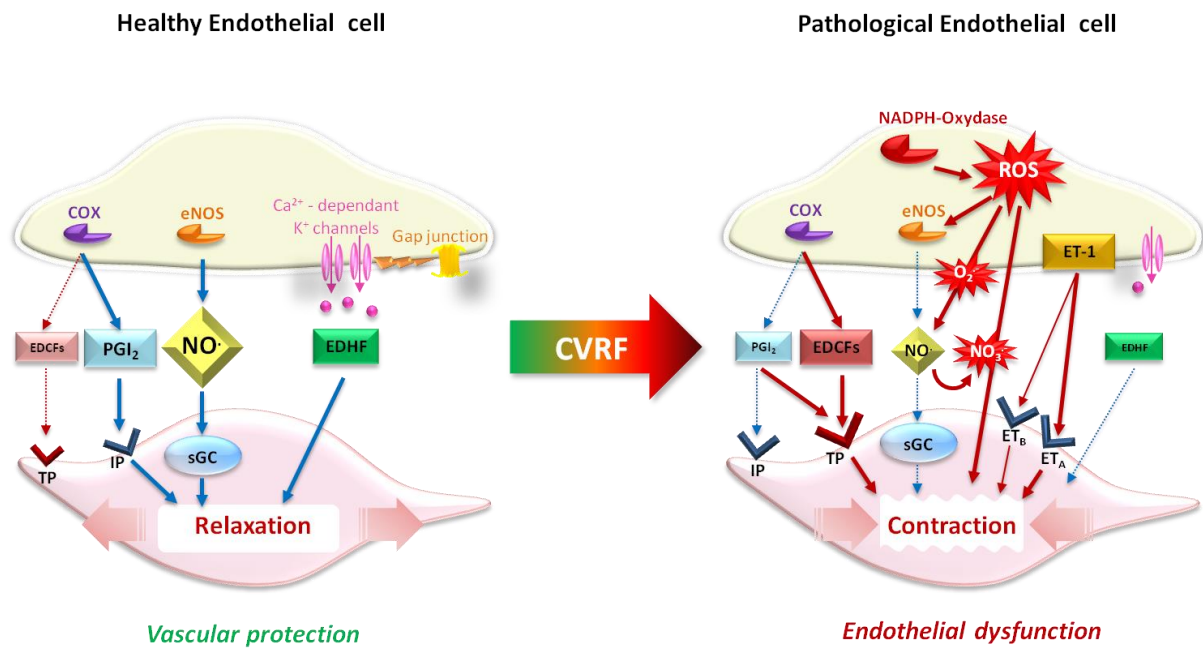


Figure 16 : Mécanismes de la dysfonction endothéliale. CVRF : cardiovasculaire risk factors ; TP : récepteurs TP ; IP : récepteurs IP ; ET-1 : endothéline 1 ; ET_A et ET_B : récepteurs à l'endothéline A et B ; EDCFs : facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium ; EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ; sGC : guanylate cyclase soluble ; NO : monoxyde d'azote ; PGI₂ : prostaglandine I₂ ou prostacycline ; eNOS : NO synthase endothéliale ; COX : cyclo-oxygénase ; O₂⁻ : anion superoxyde ; NO₃⁻ : peroxy-nitrite ; ROS : espèces réactives dérivées de l'oxygène.

Dysfonction endothéliale et âge

Des travaux cliniques ont montré qu'il existe une dysfonction endothéliale progressive en physiologie humaine chez les personnes au cours du vieillissement sans comorbidité associée, précoce dès un âge adulte jeune (18 ans), établie à partir d'une mesure non invasive de la fonction endothéliale par la dilatation médiée par le flux (DFM), comparativement à une population saine jeune ou infantile (75–77). Sur le plan fondamental, différentes études ont montré que les mécanismes impliqués dans le vieillissement artériel comprennent une surexpression des COX-1 et COX-2 avec génération d'EDCFs COX-1 dépendants, une diminution de la synthèse de PGI₂, une surexpression de la thromboxane synthase, une

augmentation de l'endothéline 1 (via une augmentation de l'expression de la prépro-endothéline-1), une augmentation de la génération de ROS et une augmentation de la proportion de la eNOS découplée (76,78–83). L'ensemble de ces modifications potentialisent le statut prothrombotique de l'artère, traduisant l'implication centrale de la dysfonction endothéliale dans le risque thrombotique artériel de la population âgée (84). Le vieillissement veineux est très peu étudié et le concept de phlébosclérose liée au vieillissement a été évoqué, résultant d'un épaissement pariétal de la veine, à potentiel prothrombogène, sans toutefois apporter les mécanismes sous-jacents ou l'existence d'une dysfonction endothéliale veineuse (85,86).

Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle

Chez des rats spontanément hypertendus SHR, l'hypertension artérielle s'accompagne d'une dysfonction endothéliale reflétée par la diminution des capacités de la relaxation d'anneaux aortiques par l'acétylcholine dans un myographe, comparativement aux rats contrôles Wistar (87). Cette baisse de la vasodilatation ne serait pas seulement due à une baisse des facteurs vasodilatateurs comme la baisse du NO mais à la génération d'EDCFs. Des travaux complémentaires ont montré que cette augmentation de la génération d'EDCFs était liée à l'augmentation des concentrations cytosoliques de Calcium chez ces rats SHR (88). Les EDCFs ainsi produits sont des prostanoides associés à une surexpression de COX-1 chez les rats SHR, surtout lors du vieillissement (78). Les effets observés lors de l'hypertension artérielle correspondraient alors à un vieillissement prématuré. Selon certains auteurs, la dysfonction endothéliale constatée chez l'homme hypertendu ne serait pas reliée à une augmentation de la pression artérielle systémique puisqu'aucune association entre le degré de dysfonction

endothéliale et les chiffres de pression artérielle n'a été démontrée (89). Par ailleurs, cette dysfonction semblerait avoir un fond génétique puisqu'elle est présente avant l'installation de l'hypertension. Les médicaments anti-hypertenseurs n'ont également pas montré une amélioration de la fonction endothéliale sous traitement. Il a été évoqué que la dysfonction endothéliale constatée chez les patients hypertendus pourrait plus être liée aux comorbidités et FRCV associés ou au fond génétique du patient. La question la plus importante serait d'apprécier la signification et le pronostic d'une dysfonction endothéliale constatée chez un patient hypertendu (89).

Dysfonction endothéliale et diabète

Une dysfonction endothéliale a été relevée en pathologie humaine dès l'enfance puisque des mesures de FMD effectuées chez des enfants diabétiques de type 1 étaient pathologiques contrairement à des enfants sains (90). Cette dysfonction endothéliale est précoce et précède la rigidité artérielle associée au diabète (91). D'autres études sont cependant discordantes puisque la dysfonction endothéliale n'a pas toujours été observée en population humaine chez les patients diabétiques. De Vriese et al. ont précisé que ces discordances sont le reflet de l'hétérogénéité des patients entre les études, qui n'étaient pas tous au même stade de la maladie (92). Lorsque ces populations ont été homogénéisées sur la présence d'une microalbuminurie, alors toutes les études montrent la présence d'une dysfonction endothéliale. Du point de vue mécanistique, cette dysfonction n'est pas similaire à celle observée en cas d'hypertension artérielle. Il semblerait qu'en cas de diabète, il existerait une diminution de la biodisponibilité de la L-Arginine nécessaire à la synthèse du NO du fait d'une suractivité de la NO synthase (93,94). De plus, contrairement à l'hypertension artérielle, il a

été montré sur des artères mésentériques de rats diabétiques qu'il existe effectivement une génération accrue d'EDCFs mais que leur inhibition par un inhibiteur non sélectif des COX (indométhacine) ne permettait pas une restauration de la fonction endothéliale traduisant ainsi un autre mécanisme de la dysfonction endothéliale en cas de diabète (95). En cas de diabète, le mécanisme physiopathologique clef serait une surproduction de ROS secondaire aux réactions de glycation en cas d'hyperglycémie, à une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase (métalloprotéase catalysant la dismutation des anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène, indispensable à l'élimination des radicaux libres) et une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase (96,97). Cependant, aucun essai clinique de grande envergure n'a pu montrer un bénéfice clinique significatif pour la prévention des maladies cardiovasculaires associées au diabète par l'utilisation de molécules anti-oxydantes (98). On sait cependant que certains anti-oxydants de mauvaise qualité comme les vitamines E et C peuvent devenir pro-oxydantes. Enfin, il n'a pas été montré que le diabète induisait une dysfonction endothéliale au niveau de la veine.

Dysfonction endothéliale et obésité

Chez l'homme, l'obésité a été associée à une altération de la fonction endothéliale mesurée par la FMD dans une méta-analyse de Ne et al. (2017) et à une augmentation de l'épaisseur intima-média (99). La perte de poids s'accompagne dans cette même méta-analyse d'une amélioration de la FMD. La dysfonction endothéliale associée à l'obésité revêt un profil particulier puisqu'elle est secondaire à un déséquilibre de production de certaines chemokines, les adipokines, du fait d'une hypertrophie du tissu adipeux. En cas d'obésité, il existe une modulation dans la répartition des adipokines avec baisse de l'adiponectine (100).

Or, l'adiponectine réduit l'expression de molécules d'adhésion au niveau de la cellule endothéliale, réduit la diapédèse leucocytaire, réduit la production des ROS induits par l'hyperglycémie. Par ailleurs, l'adiponectine favorise la phosphorylation Ser1177 de la eNOS permettant ainsi d'augmenter son activité et d'augmenter la production du NO chez l'animal (101). De plus, l'intelectine 1 (ou omentine), qui favorise l'activité de la NO synthase et limite des effets vasculaires délétères de l'inflammation est réduite en cas d'obésité, aggravant ainsi la dysfonction endothéliale (100,102). Dans le déséquilibre des adipokines dû à l'obésité, il existe également une augmentation de la production de la lipocaline-2 qui favorise la génération d'EDCFs, et de l'A-FABP (adipocyte fatty-acid binding protein, présente dans les adipocytes matures, les macrophages et les lymphocytes) ayant pour conséquence une diminution de la production de NO en potentialisant l'inhibition de l'activation de la eNOS (103). A l'inverse, une supplémentation en adiponectine atténue l'épaississement de l'intima induit par la ré-endothélialisation après une lésion vasculaire effectuée chez l'animal en diminuant la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (104). Enfin, des études chez l'animal ont montré que la surexpression d'adiponectine protège les artères du développement de l'athérome et que la déficience en adiponectine augmente la formation d'athérosclérose (105,106).

Dysfonction endothéliale et dyslipidémie

On a pu mettre en évidence chez l'homme une altération de la fonction endothéliale par mesure de la FMD chez des patients porteurs d'une hypercholestérolémie sévère isolée (107). La dyslipidémie est classiquement décrite par une augmentation du LDL-cholestérol (délétère) et une baisse du HDL-cholestérol (protecteur). Concernant le LDL-cholestérol, il a été montré

que le LDL oxydé favorisait la production d'anions superoxydes après phosphorylation de la p66Shc et induisait la génération de ROS par la eNOS elle-même, après l'avoir stimulée (108). Une dyslipidémie avec augmentation des LDL s'accompagne d'une dysfonction endothéliale dans des modèles léporins après régime high fat, lors de l'étude de la vasoréactivité aortique *in vitro*, ainsi qu'une augmentation de NF- κ B, facteur de transcription induit par le stress oxydant (109). Le HDL-bas pourrait être associé à une dysfonction endothéliale puisque la sphingosine 1-phosphate associée au HDL peut se lier à son récepteur endothélial S1P₁ pour favoriser l'activation de la eNOS et de la kinase Akt (110). D'autres travaux menés chez le petit animal ont montré que l'oxydation lipidique réduit l'activité biologique du NO sans affecter la eNOS et que la dysfonction endothéliale induite par l'hypercholestérolémie diffère selon les territoires vasculaires artériels étudiés (la dysfonction endothéliale générée dans l'aorte n'était pas secondaire à des prostanoides vasoconstricteurs agonistes des récepteurs TP, contrairement à celle générée dans l'artère mésentérique supérieure) (111). Dans le même sens, la génération de prostanoides vasoconstricteurs comme le TXA₂ est augmentée dans les artérioles chez les souris ApoE (112).

Dysfonction endothéliale veineuse

Peu de travaux se sont intéressés à la dysfonction endothéliale veineuse à notre connaissance. On sait cependant d'après les travaux de De Mey et Vanhoutte (1982) que les veines ne réagissent pas de la même façon que les artères en situation physiologique, en ce qui concerne leur réponse vasodilatatrice *ex vivo* (113). La relaxation induite *ex vivo* est plus faible voire absente en fonction des territoires veineux et de l'agent vasorelaxant utilisé, comparativement à l'artère (expériences menées sur des veines fémorales, pulmonaires,

saphènes et spléniques en réponse à différents agents pharmacologiques vasorelaxants comme l'acétylcholine, l'ATP, l'adénosine ou l'isoprénaline). Il a également été montré chez le rat que la relaxation de la veine fémorale était à la fois liée à l'EDH et au NO (114). Les cellules musculaires lisses des veines seraient également plus sensibles à l'endothéline que celles des artères (115). Des travaux ont également montré que la vasomotricité de la veine pouvait être modulée par les stéroïdes sexuels. Il est ainsi possible d'induire une relaxation de la veine périphérique après une contraction induite par le U46619 en utilisant des concentrations croissantes de lévonorgestrel en présence d'indométhacine dans des veines jugulaires de lapin (116). Le mécanisme sous-jacent est cependant une relaxation endothélium-indépendante par inhibition de l'entrée du calcium dans la cellule musculaire lisse et une activation de la protéine kinase C. Une étude de vasorelaxation *in vivo* chez l'homme dans des pontages veineux saphènes a montré que les veines saphènes présentaient une réponse relaxante faible lors de l'infusion d'acétylcholine ou de nitroprussiate de sodium (SNP) comparativement à une artère saine, sans comparaison à une veine saine *in situ* (117). Une autre étude sur des veines saphène humaines a comparé la vasoconstriction induite par la noradrenaline entre des veines saphènes saines et des veines variqueuses. Une réduction de la réponse contractile à la noradrenaline a été observée dans les veines variqueuses comparativement aux veines saines sans identification du mécanisme sous-jacent (118). La problématique de l'étude des veines humaines (patient vivant) est qu'elle ne peut se faire que sur des veines superficielles prélevables (veines saphènes ou non saphènes) qui n'ont peut-être pas les mêmes mécanismes de fonctionnement que les veines profondes, pourtant sièges de la maladie veineuse thrombo-embolique. Il peut ainsi sembler hasardeux de transposer les mécanismes de fonctionnement des veines superficielles, de surcroît pathologiques comme les veines variqueuses, que ce soit d'origine animale ou humaine, à des veines profondes.

Nous ne connaissons pas d'autre étude ayant développé les caractéristiques de la fonction endothéliale veineuse périphérique, des mécanismes sous-jacents et du risque potentiel pro-thrombogène de la dysfonction endothéliale veineuse, en particulier de celle possiblement induite par les facteurs de risque cardiovasculaires.

Oméga-3 et modulation du métabolisme de l'acide arachidonique

Parmi les acides gras, on distingue les acides gras polyinsaturés qui sont retrouvés dans les membranes cellulaires pour assurer fluidité membranaire et fonction cellulaire. Il existe deux familles d'acides gras polyinsaturés dits essentiels car non synthétisés dans le corps humain et issus de l'alimentation, les oméga-6 (le 6^{ème} carbone porte la double liaison la plus proche du groupe méthyle terminal) et les oméga-3 (où le 3^{ème} carbone porte la double liaison) (119,120). Le chef de file de la famille des oméga-6 est l'acide linoléique, retrouvé dans les huiles alimentaires d'origine végétale, et l'acide alpha-linolénique, chef de file des oméga-3, retrouvé particulièrement dans les huiles de poisson.

L'acide arachidonique, messenger secondaire lipidique et régulateur d'enzymes, est synthétisé à partir de l'acide linoléique (oméga-6). L'acide arachidonique est le précurseur des eicosanoïdes (121):

- les prostanoides obtenus à partir de l'action des COXs (impliqués notamment dans la vasoréactivité, l'agrégation plaquettaire et l'inflammation),
- les leucotriènes issus de l'acide 5-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque (5-HPETE) *via* la 5-lipoxygénase (impliqués dans les phénomènes inflammatoires et allergiques),

- les acides époxyeicosatriénoïques et hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) *via* les époxygénases.

Le métabolisme de l'acide arachidonique issu des oméga-6 va subir l'action enzymatique des COX pour former les prostanoides. L'acide alpha-linolénique (oméga-3) va subir différentes étapes catalytiques pour former l'acide eicosapentaénoïque (EPA) puis *in fine* l'acide docosahexaénoïque (DHA) (122). L'EPA va inhiber la libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires par la phospholipase A₂ et inhiber de manière compétitive l'oxygénation de l'acide arachidonique par les COXs (123). Il y aura donc une suppression de la génération de prostanoides dérivés de l'acide arachidonique pour former des prostanoides dérivés de l'EPA, dont les actions biologiques sont différentes. En effet, l'EPA va mener à la génération de prostaglandine E₃ (PGE₃) ayant une action plutôt anti-inflammatoire, de thromboxane A₃ (TXA₃), moins pro-agrégant que le TXA₂ et de Prostaglandine I₃ (PGI₃), plus vasodilatatrice que la PGI₂ (Figure 17) (124). De manière parallèle, les dérivés leucotriéniques de l'EPA auraient plus de propriétés anti-inflammatoires. Par ailleurs, les résolvines et les protectines issues de la dégradation des Oméga-3 (*via* la COX-2 pour les résolvines et *via* la 5-lipoxygénase pour les protectines) ont des effets anti-inflammatoires avec des propriétés anti-athérosclérotiques en réduisant l'expression des cytokines pro-inflammatoires, en augmentant l'expression des cytokines anti-inflammatoires au niveau de la cellule endothéliale et des macrophages et en réduisant l'expression des molécules d'adhésion (125). La résultante théorique est que les eicosanoïdes dérivés des oméga-3 seraient plus protecteurs que ceux issus de l'acide arachidonique et donc des oméga-6. Ce concept théorique conduit à des résultats discordants concernant le bénéfice des oméga-3 en pratique clinique courante chez l'homme pour la prévention des événements cardio-vasculaires. Pour exemple, des niveaux bas d'acides gras polyinsaturés dérivés des oméga-6 circulants étaient

significativement associés à une décompensation cardiaque aigue, les niveaux circulant d'oméga-3 n'ayant une association ni négative ni positive (126). Une autre étude au contraire, a montré que les ratios EPA/Acide arachidonique et Oméga-3/Oméga-6 bas chez des patientes à haut risque cardiovasculaire hémodialysés étaient significativement associés à une athérosclérose carotidienne (127). Une grande méta-analyse de la Cochrane Database portant sur plus de 36 000 patients a montré qu'il n'y avait pas de bénéfice significatif à un traitement additionnel par oméga-3 pour la prévention de la mortalité totale ou des évènements cardiovasculaires (128). Les auteurs mettent cependant en avant une hétérogénéité statistique significative. Une autre méta-analyse de la Cochrane Database n'a pas non plus montré de bénéfice significatif de la supplémentation en oméga-3 chez les patients porteurs d'une artériopathie oblitérante des membres inférieurs sur la qualité de vie, la distance de marche ou les paramètres hémodynamiques associés à la maladie (129). Il est également important de souligner que dans les études ayant notamment servies à la méta-analyse 1) la population de patients diabétiques est très hétérogène d'une étude à l'autre 2) le nombre de patients inclus pouvait être faible 3) la durée de traitement n'était pas la même entre les études 4) la quantité des Oméga-3 était très différente d'une étude à l'autre (pouvant aller d'un rapport de 1 à 10) et 5) la qualité des produits utilisés n'était pas la même. L'ensemble de ces facteurs pris en considération ne permettent pas de valider le non-bénéfice d'un traitement par Oméga-3. Toutes les méta-analyses sont unanimes : d'autres études cliniques de bonne méthodologie sont nécessaires pour conclure quant au bénéfice ou non d'une supplémentation en oméga-3 dans l'alimentation pour la prévention des affections cardio-vasculaires.

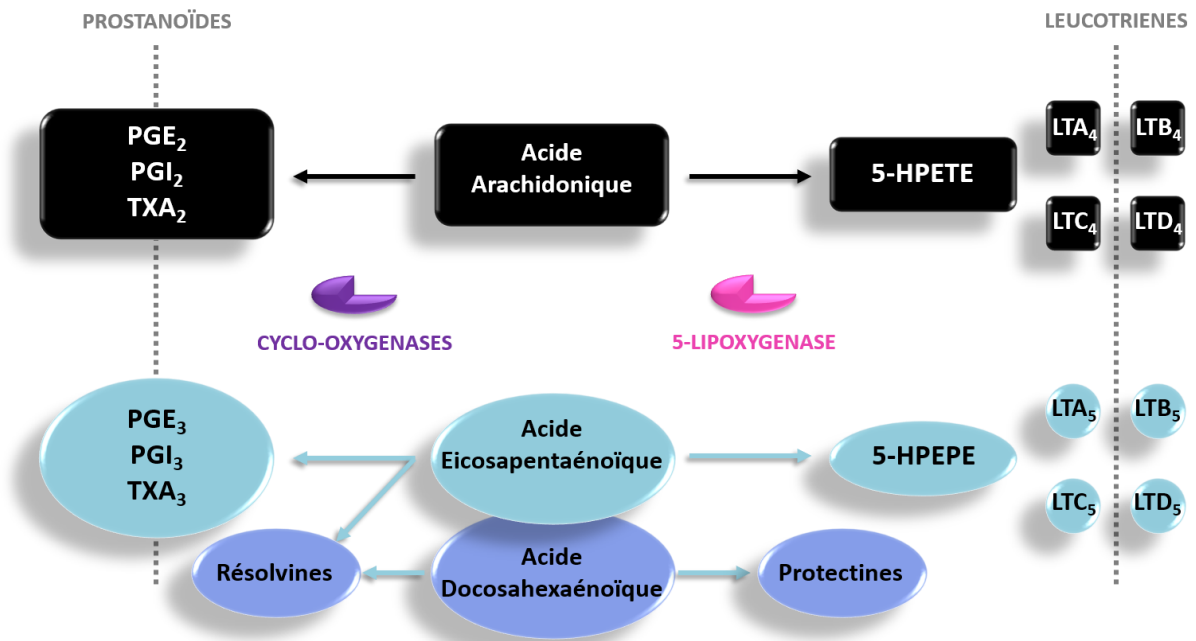


Figure 17 : Métabolisme des acides gras poly-insaturés des séries oméga-3 et oméga-6. D'après Wiktorowska-Owczarek et al. 2015 (124). PGE : prostaglandine E, PGI : prostaglandine I, TXA : thromboxane, 5-HPEPE : acide 5-hydroxyperoxyeicosapentaénoïque, 5-HTETE : acide 5-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque, LT : leucotriènes des séries 4 (LTA₄, LTB₄, LTC₄ et LTD₄) et séries 5 (LTA₅, LTB₅, LTC₅ et LTD₅).

Première étude : influence des facteurs de risque cardiovasculaires d'athérosclérose sur le risque de thrombose veineuse non provoquée à partir d'une étude de cohorte prospective de patients issus du registre REMOTEV

Introduction

La maladie veineuse thrombo-embolique (MVTE) est la 3^e pathologie cardiovasculaire la plus fréquemment rencontrée pouvant exposer au risque de décès lié à la gravité de l'embolie pulmonaire et au risque de séquelles chroniques invalidantes secondaires au syndrome post thrombotique aux membres inférieurs. La MVTE dispose d'un moyen de traitement efficace de la prévention des récives, à savoir le traitement anticoagulant. L'anticoagulation expose cependant à un risque hémorragique motivant pour chaque patient une réflexion portant sur la stratégie thérapeutique à adopter, parfois sur le degré d'intensité de l'anticoagulation mais surtout sur la durée de traitement en évaluant la balance bénéfice antithrombotique *versus* risque hémorragique. Il est donc capital en pratique de soins courants d'identifier les facteurs de risque de thrombose veineuse pour mieux cibler les patients les plus à risque et qui bénéficieront le plus d'un traitement anticoagulant au long cours sans leur faire un courir un risque hémorragique inconsidéré. Malgré l'identification de certains facteurs favorisants majeurs de MVTE, 30 à 50% des épisodes demeurent idiopathiques. Le caractère non provoqué de la MVTE représente un des marqueurs de risque de récive les plus importants. C'est pourquoi l'identification de facteurs de risque alternes est essentielle, pour une meilleure prédiction de récive pour un individu donné. Depuis plusieurs années, des études

épidémiologiques mettent en avant un lien entre les facteurs de risque cardiovasculaires (FRCV) d'athérosclérose (âge, hypertension, diabète, dyslipidémie, obésité, tabagisme) et le risque de thrombose veineuse non provoquée. Les études sont cependant discordantes entre elles concernant le risque de thrombose veineuse non provoquée associé à un FRCV donné, le risque relatif étant en général faible. Les travaux de la littérature sont cependant unanimes concernant le risque accru de MVTE non provoquée chez les patients porteurs d'un syndrome métabolique, qui repose sur l'association de multiples FRCV : hyperinsulinisme avec hyperglycémie, obésité viscérale, dyslipidémie avec hypertriglycéridémie et hypo-HDL-émie, hypertension artérielle. Ce concept est encore difficile à appréhender de nos jours, puisqu'il est usuel de séparer FRCV d'athérosclérose et risque de thrombose artérielle des facteurs de risque de MVTE et risque de thrombose veineuse.

L'objectif de ce travail était d'évaluer si le cumul des facteurs de risque cardiovasculaires majeurs d'athérosclérose pouvait être associé à un risque accru de thrombose veineuse non provoquée comparativement au risque individuel de chaque FRCV, par l'étude d'un registre prospectif de patients non sélectionnés, hospitalisés consécutivement dans le service d'Hypertension et Maladies Vasculaires au CHRU de Strasbourg pour un épisode de MVTE (Registre REMOTEV).

Increased risk and severity of unprovoked venous thromboembolism with clustering cardiovascular risk factors for atherosclerosis: results of the REMOTEV registry

S. Gaertner*(1), E.-M. Cordeanu*(1), C. Mirea*(1), A.-S. Frantz*(1), C. Auger*(3), P. Bilbault*(2), P. Ohlmann*(4), V. Schini-Kerth*(3), D. Stephan*(1)

(1) Department of vascular medicine and clinical pharmacology, Strasbourg Regional University Hospital, France

(2) Emergency department, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg Regional University Hospital, France.

(3) Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR CNRS 7213, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, France

(4) Department of cardiology, Strasbourg Regional University Hospital, France

Corresponding author: Sébastien GAERTNER, Hypertension et maladies vasculaires, CHRU, 1 place de l'hôpital 67091 BP 426 Strasbourg, France

Email: sebastien.gaertner@chru-strasbourg.fr

Keywords: Venous Thromboembolism, unprovoked, cardiovascular risk factors, atherosclerosis

Abstract

Background: The role of cardiovascular risk factors (CVRF) for atherosclerosis in venous thromboembolic disease (VTE) is controversial. The aim of this study was to evaluate the impact of CVRF and their cumulative effects on the occurrence of unprovoked VTE, severity, recurrence and survival.

Methods and results: This is a prospective cohort from the REMOTEV registry including all consecutively hospitalized patients for acute symptomatic VTE. From November 2013 to December 2016, 515 patients with 6 months follow-up (FU) were selected for the analysis. Events were classified as unprovoked or provoked VTE. In univariate analysis, hypertension (OR 1.44, [95% CI 1.01-2.06]), diabetes (OR 2.07, [95% CI: 1.25-3.55]) and age (OR 1.94, [95% CI: 1.31-2.88]) were significantly associated with the risk of unprovoked VTE. After adjustment, diabetes (OR 1.82, [95% CI: 1.07-3.18]) and age (OR 1.79, [95% CI: 1.15-2.8]) remained associated with the risk of unprovoked VTE. The proportion of unprovoked VTE increased significantly with the number of CVRF adjusted for thrombophilia (1 CVRF: OR 3 [95% CI: 1.44-6.52]) 2 CVRF: OR 4.33 [95% CI: 2.07-9.49] and ≥ 3 CVRF: OR 4.58 [95% CI: 2.27-9.7]). The severity of pulmonary embolism was significantly associated with CVRF clustering. There were more VTE recurrences and deaths during the 6 months of FU with cumulative CVRF.

Conclusion: the risk of unprovoked VTE and PE severity are associated with clustering CVRF. The role of cumulative CVRF predominates rather than the specific burden of each of the CVRF in the risk of VTE occurrence.

Introduction

Venous thromboembolism (VTE) is the third most common cardiovascular disease after coronary artery disease and heart failure. Its annual incidence in Western Europe and North America is estimated to be between 0.6 and 1.83 per thousand people / year [1–3]. The identification of transient or persistent VTE risk factors modulates recurrence frequency and guides the duration of treatment. However, 30-50% of VTE events remain unprovoked, with no clearly identifiable cause [4–6]. The unprovoked nature of the thrombotic episode is an essential marker of the risk of recurrence and determines the decision to treat with long-term anticoagulation [7,8]. In those patients, presence of potential risk factors, either environmental or constitutional, becomes *de facto* a diagnostic and therapeutic issue, and also upstream a potential research orientation exploring the pathophysiology of the venous thrombus formation.

Previous research has explored the hypothesis that cardiovascular risk factors (CVRF) for atherosclerosis are involved in the occurrence of VTE. Cohort studies or clinical trials have investigated the association of modifiable conventional CVRF (*i.e.*, smoking, high blood pressure (HBP), diabetes, obesity and dyslipidemia) and the risk of VTE [9–12]. In a trial measuring the prevalence of the subclinical atherosclerosis, Prandoni et al. showed a link between CVRF and unprovoked VTE [9]. Other authors reported an increase in the frequency of cerebrovascular and cardiovascular events after an episode of VTE [13,14]. A meta-analysis of studies connecting CVRF and VTE showed for the first time the existence of an excess risk of VTE associated with standard risk factors for atherosclerosis. However, this study has shown that if the relative risk of each parameter is low, their cumulative effect may explain the causal effect [15]. Thus, the metabolic syndrome, adding by definition at least three among the

following: HBP, obesity, diabetes and dyslipidemia is associated with an unprovoked VTE [16,17].

Indirect evidence of the relationship between CVRF and VTE is provided by previous therapeutic trials. In primary prevention, several observational cohort and case-control studies appear to show that statins reduce the incidence of VTE by about 30% [18]. In the single randomized placebo-controlled clinical trial (JUPITER) conducted, which included 17,000 patients, rosuvastatin reduced the risk of VTE by 43%. In secondary prevention, several observational studies and post-hoc analyses of randomized clinical trials have suggested that statins may prevent recurrence of VTE [19]. In the WARFASA study, for secondary prevention of VTE in patients with an unprovoked episode, low dose aspirin reduced the frequency of VTE recurrences by 40% [20]. This result was confirmed by the ASPIRE study and the INSPIRE meta-analysis of the individual data [21,22]. The results obtained with statins and aspirin suggest that drugs known for their anti-atherothrombotic properties would also have an effect on the genesis of the venous thrombus.

In this study, our main objective was to measure the impact of CVRF and their cumulative effects on the risk of VTE in a prospective cohort of patients hospitalized for a symptomatic VTE episode. We corroborated the possible role of CVRF by measuring the effect of their accumulation on the severity and prognosis of venous thromboembolic events.

Patients and methods

Study Design and patient Selection

REMOTEV is an ongoing, prospective, observational registry of all consecutive patients hospitalized in the department of vascular medicine of the University Hospital of Strasbourg for an acute episode of deep vein thrombosis (DVT) or pulmonary embolism (PE) [23]. For this analysis, we defined two groups of patients according to whether the index episode was provoked or not [24]. VTE events were classified as provoked in the presence of the following risk factors: recent surgery, prolonged immobilization (more than 3 days), recent trip (travelling at least 6h in the previous 3 weeks), active cancer, pregnancy or postpartum, estrogen hormone therapy (oral contraception or hormone replacement therapy) [24]. In the absence of any of these risk factors, the thrombotic event was considered as unprovoked. Screening for thrombophilia was performed according to the current guidelines [1]. The presence of a hereditary thrombophilia did not qualify the event as provoked and carriers of thrombophilia were classified as having provoked or unprovoked VTE according to the presence or not of an environmental provoking factor [6]. We analyzed the clinical characteristics of patients, treatments and events occurring within the first 6 months after the diagnosis of VTE in both groups: provoked and unprovoked. Patients with known active cancer or cancer diagnosed during follow-up (FU) were excluded from the analysis because of peculiar cancer-related thrombosis history (*i.e.* higher thrombotic recurrence risk, high mortality rate due to cancer progression, etc.) that may represent a significant bias. Patients were informed of the purpose of the registry and gave oral consent to their participation according to the requirements of the local ethics committee. Data were anonymized and stored in a computer database.

VTE diagnosis

The presence of PE or DVT was confirmed by standardized and validated imaging procedures [1,25]. The episode of PE or DVT (index event) was reported. PE was confirmed by either CT pulmonary angiogram (CTPA) or ventilation perfusion lung scan. Patients with symptomatic PE were routinely screened for DVT. The presence of DVT was assessed by ultrasonography from inferior vena cava to calf veins in both lower limbs. The diagnosis of acute coronary syndrome was excluded for all patients included (gradual use of appropriate complementary examinations if necessary).

Baseline variables of the study population

Age, sex, height and weight parameters were collected. Renal function was assessed at admission and the estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated according to the abbreviated Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) equation. Cardiac biomarkers, troponin I and BNP, as well as right ventricular dilatation on CTPA and/or transthoracic echocardiography were identified in order to establish PE severity according to the 2014 ESC Guidelines for PE management based on the short-term mortality risk [1].

Cardiovascular risk factors

Seven major traditional risk factors for atherosclerosis were recorded at hospitalization and included age (more than 50 years for a man and more than 60 years for a woman), active smoking, diabetes, HBP, dyslipidemia, obesity (defined by a BMI greater than 30kg/m²) or family history of coronary heart disease (CHD), defined as an immediate relative diagnosed

with CHD before 55 years of age for men and 65 years for women. These risk factors were identified before and during hospitalization, as documented in the medical record, and were based on patient/family self-report or previous medical records. The combination of risk factors resulted from the summation of individual CVRF.

Anticoagulant therapy

The type, dosage and duration of anticoagulant therapy were based on current guidelines [1,26,27]. The anticoagulant treatment included either a direct oral anticoagulant (rivaroxaban 15mg bid for 21 days and then 20mg od without dose reduction) or unfractionated heparin, low molecular weight heparin (LMWH), fondaparinux at the beginning of hospitalization, relayed by antivitamin K with a target INR between 2 and 3. In case of contraindication to an oral anticoagulant or in exceptional therapeutic situation excluding cancer, a parenteral treatment with LMWH has been established in the long term. Indications of thrombolysis, thromboaspiration, thrombectomy or inferior vena cava filter placement were based on current guidelines [1,27]. All patients received at least 6 months of anticoagulant therapy whether the event was provoked or not.

Follow-up and outcome assessment

In this study, we monitored patients over a period of 6 months after the occurrence of the index event. All patient data were collected at the initial visit and then by phone interview at 1 month (\pm 5 days), 3 months (\pm 10 days) and 6 months (\pm 15 days). The primary endpoints were recurrence of VTE, major cardiovascular events (MACE), and all-cause mortality. All

symptomatic DVT or PE were acknowledged as VTE recurrence when a diagnostic imaging procedure confirmed the presence of new thrombosis (CTPA, ventilation / perfusion lung scan or duplex ultrasound). MACE included myocardial infarction, stroke and non PE-related sudden death.

Statistical analysis

Variables were described as number of cases (percentages) for categorical variables and as mean (\pm standard deviation) for continuous variables. Non-normally distributed variables were described as median (10-90th percentiles). Patients were divided according to the number of their cardiovascular risk factors, *i.e.*: 0, 1, 2, 3 or more. The risk of unprovoked VTE associated with each CVRF was assessed by univariate analysis. The Mantel-Haenszel χ^2 test was used for trend in binomial proportions. The proportion of unprovoked episodes based on the number of risk factors was compared using a Chi2 test, with an alpha level of 0.05 used as the cutoff for significance. Any CVRF having a univariate test with a p-value cut-off point of 0.20 was selected as a candidate for the multivariate logistic regression analysis. The Kaplan-Meier estimator was used to compute survival curves over the 6-month FU for deaths and recurrences in each group. MACE were expressed as the number of events over a 6-month FU period.

Results

Baseline characteristics in provoked versus unprovoked VTE groups

Between November 2013 and December 2016, 604 patients were hospitalized for VTE. All cancer patients (known active cancer at the time of the index event or diagnosed during FU) were excluded from the present study (n = 89). Overall, 515 cancer-free patients, followed for 6 months were included in this analysis. Among them, 190 (36.7%) patients suffered from provoked VTE while for 325 patients (63.1%), no causal factor for VTE was identified (unprovoked group) (Table 1). The proportion of males and females differed significantly between the unprovoked and provoked groups (Table 1). This disparity is mainly explained by the high frequency of hormonal therapy including estrogens in the provoked group (55 women in total, corresponding to 28.9% of the provoked VTE). Patients presenting with an unprovoked event were significantly older (respectively: 66.1 years vs 59.7 years, $p < 0.001$). The proportions of HBP and diabetes were significantly different between the two groups (HBP: 56.4% in the unprovoked group vs 47.4% in the provoked group, $p = 0.05$; diabetes: 21.3% in the unprovoked group vs 11.6% in the provoked group, $p < 0.01$) (Table 1). There was no difference in the proportion of patients with renal insufficiency between the 2 groups (1.9% in the unprovoked group versus 2.6%).

In 319 cases (61.9%), the index event was a PE with concomitant DVT. Approximately one-quarter of patients (n = 138) had isolated PE and 11.3% (n = 58) had DVT without symptomatic PE. For patients with PE, the severity of the event was graded: "low risk" in 237 patients (51.9%), "intermediate risk" (low and high) in 210 patients (46%) and "high risk" in 10 patients (2.2%). The overall comparison of the severity between unprovoked and provoked VTE

showed no difference between groups. However, in patients with unprovoked VTE, PE was less likely to be at "low risk" than in case of provoked VTE (49.8% vs 56.4%).

Thrombophilia, known or revealed during hospitalization, was found in a similar proportion in the 2 groups (unprovoked: 3.8% vs provoked: 4.7%) and was not associated with unprovoked VTE (OR 1,05 [95% CI: 0.43-2.7]). A history of VTE was more often found in the unprovoked (36%) than in the provoked group (24.2%) ($p < 0.01$). The frequency of the cardiovascular disease history, including myocardial infarction, stroke and peripheral artery disease of the lower limbs, was not different between the two groups.

In this study, irrespective of whether VTE was provoked or not, most patients benefited from a direct oral anticoagulant (rivaroxaban); respectively: 76.4% in the unprovoked group and 70.5% in the provoked group.

Impact of CVRF on the risk of unprovoked VTE

In univariate analysis, the individual risk of unprovoked VTE was significantly higher for HBP OR 1.44 [95% CI: 1.01-2.06], diabetes OR 2.07 [95% CI: 1.25-3.55], and age OR 1.94 [IC 95%: 1.31-2.88]. In multivariate analysis, diabetes OR 1.82 [95% CI: 1.07-3.18, $p < 0.05$] and age OR 1.79 [95% CI: 1.15-2.8, $p < 0.05$] remained significantly correlated with unprovoked VTE (Table 2).

We examined patients' distribution according to the cumulative number of CVRF. The proportion of unprovoked VTE was significantly higher in patients with one or more CVRF compared to those without CVRF (32% for 0 CVRF; 58% for 1 CVRF, $p < 0.05$; 67% for 2 CVRF, $p < 0.05$ and 68% for 3 or more CVRF, $p < 0.05$) (Table 2 - Figure 1A). The absence of CVRF

constituting the reference, the OR expressing the risk of unprovoked VTE for 1 CVRF (regardless of the CVRF and adjustment for thrombophilia) was 3 [95% CI: 1.44-6.52], for 2 CVRF, OR was 4.33 [95% CI 2.07-9.49] and for 3 or more CVRF, OR was 4.58 [95% CI: 2.27-9.7]. The OR by CVRF independently of its nature was 1.43 [95% CI: 1.19-1.72] (Table 2).

PE severity was evaluated according to the cumulative number of CVRF. We generally observed a direct relationship between the number of CVRF at presentation and the proportion of patients with more severe forms of PE (« intermediate-high risk » and « high risk » PE): highest in patients with at least 3 CVRF (36%) and lowest in patients with 0 CVRF (10%) (Figure 1B). In the age-adjusted statistical model, cumulative number of CVRF remained associated with the risk of unprovoked VTE and the severity of PE.

Recurrence and survival rates were calculated for patients who completed the 6-month FU. Figure 2 shows recurrence and mortality stratified by the number of CVRF at presentation. Patients with few or no CVRF were less likely to have a VTE recurrence (Figure 2A). Among patients with 0 to 3 or more CVRF, there was a higher mortality with the increasing number of CVRF (Figure 2B). During the 6 month FU, there were 4 deaths directly related to a cardiovascular origin: 1 death for a patient with one CVRF and 3 deaths for patients with 3 or more CVRF. There was no myocardial infarction or stroke during the 6-month FU after the index event.

Discussion

Our study showed that CVRF-associated risk of unprovoked VTE was higher when considering their accumulation as compared to the individual risk of each CVRF, even after adjustment for thrombophilic conditions. In addition, we observed that cumulative CVRF were associated with PE severity. Moreover, our analyses also found a direct relationship between the number of recurrence and deaths and the cumulative number of CVRF. These results suggest that CVRF may play a role in the occurrence of VTE.

Using a multivariate regression model, we showed that only diabetes and age were significantly associated with the risk of unprovoked VTE. These results differ from those of the Copenhagen City Heart Study cohort analysis which were already not in agreement with the findings of Ageno *et al.* [15,28]. For the latter, obesity, HBP and diabetes were associated with an increased risk of VTE [15] while in the Copenhagen population study, obesity, HBP, tobacco use, and male sex played a role in VTE occurrence [28]. More recently, in a meta-analysis carried out on prospective studies, Mahmoodi *et al.* evaluated the association of CVRF with VTE according to whether the event was provoked or unprovoked [29]. These authors showed that after adjustment for age, no CVRF was independently associated with the occurrence of unprovoked VTE. These disparities attest to the difficulty one has associating one specific CVRF with an excess risk of VTE.

As proven in cardiovascular diseases, where the global risk can be estimated by summing the major CVRF, several authors have highlighted the predominant role of total cardiovascular burden in the occurrence of VTE. Thus, Ageno *et al.* showed a significant association between metabolic syndrome, comprising several CVRF (*i.e.* HBP, obesity, low HDL-cholesterol and high fasting blood sugar), and VTE risk [16].

Subclinical atherosclerosis is another expression of the cumulated effect of CVRF on the arterial vasculature that has been robustly correlated to VTE risk by several studies. Milan *et al.* showed that the prevalence of subclinical or symptomatic atherosclerosis was higher in case of unprovoked than in provoked VTE and matched controls [30]. Moreover, residual vein thrombosis (RVT) seems to be associated to subclinical atherosclerosis and was correlated to a three-fold higher incidence of increased intima/media thickness and carotid plaque in unprovoked VTE in the absence of a significant correlation with individual risk factors [31]. According to the findings of Prandoni *et al.* RVT also seems to be a powerful and independent predictor of subsequent symptomatic atherosclerotic events [32].

The original contribution of our study is to show that clustering CVRF constituted a potential risk in the occurrence of unprovoked VTE. Similarly, to prior reports, the method of comparison used here was a measurement of the CVRF accumulation in the group of patients who were victims of unprovoked vs provoked VTE [9,29]. In fact, it is precisely in patients with unprovoked VTE: 1) that no provocation factor is identified; 2) a difference in CVRF burden can emerge compared to the group of patients in whom VTE recognizes identified standard risk factor(s). One of the limitations of previous reports was the lack of adjustment for age, a major risk factor in VTE [15,29]. However, in our study, the relationship between clustering CVRF and VTE persists after age adjustment, suggesting that modifiable CVRF play an important role.

Furthermore, we observed a significant association between cumulative CVRF and PE severity, regardless of age. To our knowledge this is the first study demonstrating such a correlation. This finding reinforces the hypothesis that CVRF are involved in the determinism and prognosis of VTE. However, in our study, this association was not related to the presence of a history of

arterial cardiovascular diseases which conveys the assumption of a direct venous effect. At the same time, we showed that the number of VTE recurrences and deaths during anticoagulant therapy is greater when the patients cumulate CVRF. However, this difference did not reach the level of significance, probably because of the 6-month duration of FU which was appropriate for VTE but too short for atherosclerotic complications occurrence.

In our study, CVRF were identified based on anamnestic data and / or the presence of current treatment. Most patients were treated with either hypotensive drugs, cholesterol-lowering or antidiabetic medications. The importance of a CVRF-driven residual vein risk in patients with optimal medical treatment and controlled CVRF remains hardly measurable.

Taken together, our results suggest a direct involvement of CVRF in the pathogenesis of VTE. Some authors correlated atherosclerosis and VTE through the pathways of inflammation and activated coagulation. Thus, an increase in vascular wall remodeling or subclinical atherosclerosis has been demonstrated in patients with VTE [33,34]. Furthermore, atherosclerotic CVRF induce arterial endothelial dysfunction, oxidative stress, and perivascular inflammation and prothrombotic factors overexpression [35–41]. However, impacts of CVRF on the vein, its structure and function, remain unknown. Recent literature has shown a significant impairment of the endothelial function and an excess of adhesion proteins (VCAM and ICAM) after an episode of acute PE [42]. Nevertheless, to date, the impact of CVRF on the venous system is not known, in particular the hypothesis of a CVRF-induced venous endothelial dysfunction.

In conclusion, our results confirm a correlation between clustering CVRF and the increased risk of unprovoked VTE and its severity. The role of cumulative CVRF seems to predominate

compared to the specific burden of each CVRF, although, to date, the precise mechanism of their venous prothrombotic action is not known.

Acknowledgments

The authors thank Isabelle Le Ray for her support in the statistical analyses.

References

1. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 2014;35:3033–3069, 3069a–3069k.
2. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O’Fallon WM, Melton LJ. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med*. 2000;160:809–15.
3. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d’Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost*. 2000;83:657–60.
4. Tagalakis V, Patenaude V, Kahn SR, Suissa S. Incidence of and mortality from venous thromboembolism in a real-world population: the Q-VTE Study Cohort. *Am J Med*. 2013;126:832.e13-21.
5. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation*. 2003;107(23 Suppl 1):I4-8.
6. Kearon C, Ageno W, Cannegieter SC et al. Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: guidance from the SSC of ISTH. *J Thromb Haemost*. 2016;14:1480–3.
7. Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. *Lancet*. 2003;362:523–6.
8. Kyrle PA, Rosendaal FR, Eichinger S. Risk assessment for recurrent venous thrombosis. *Lancet*. 2010;376:2032–9.
9. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med*. 2003;348:1435–41.
10. Eliasson A, Bergqvist D, Björck M, Acosta S, Sternby NH, Ogren M. Incidence and risk of venous thromboembolism in patients with verified arterial thrombosis: a population study based on 23,796 consecutive autopsies. *J Thromb Haemost*. 2006;4:1897–902.
11. Van der Hagen PB, Folsom AR, Jenny NS et al. Subclinical atherosclerosis and the risk of future venous thrombosis in the Cardiovascular Health Study. *J Thromb Haemost*. 2006;4:1903–8.

12. Reich LM, Folsom AR, Key NS et al. Prospective study of subclinical atherosclerosis as a risk factor for venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2006;4:1909–13.
13. Becattini C, Agnelli G, Prandoni P et al. A prospective study on cardiovascular events after acute pulmonary embolism. *Eur Heart J.* 2005;26:77–83.
14. Bova C, Marchiori A, Noto A et al. Incidence of arterial cardiovascular events in patients with idiopathic venous thromboembolism. A retrospective cohort study. *Thromb Haemost.* 2006;96:132–6.
15. Ageno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. *Circulation.* 2008;117:93–102.
16. Ageno W, Prandoni P, Romualdi E et al. The metabolic syndrome and the risk of venous thrombosis: a case-control study. *J Thromb Haemost.* 2006;4:1914–8.
17. Dentali F, di Minno MN, Gianni M, di Minno G, Squizzato A, Ageno W. The role of the metabolic syndrome in patients with provoked venous thromboembolic events. *Thromb Haemost.* 2013;109:759–61.
18. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med.* 2008;359:2195–207.
19. Gaertner S, Cordeanu E-M, Nouri S, Mirea C, Stephan D. Statins and prevention of venous thromboembolism: Myth or reality? *Arch Cardiovasc Dis.* 2016;109:216–22.
20. Becattini C, Agnelli G, Schenone A et al. Aspirin for preventing the recurrence of venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2012;366:1959–67.
21. Brighton TA, Eikelboom JW, Mann K et al. Low-dose aspirin for preventing recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2012;367:1979–87.
22. Simes J, Becattini C, Agnelli G et al. Aspirin for the prevention of recurrent venous thromboembolism: the INSPIRE collaboration. *Circulation.* 2014;130:1062–71.
23. Gaertner S, Cordeanu E-M, Nouri S et al. Rivaroxaban versus standard anticoagulation for symptomatic venous thromboembolism (REMOTEV observational study): Analysis of 6-month outcomes. *Int J Cardiol.* 2017;226:103–9.
24. Pedrajas JM, Garmendia C, Portillo J et al. Idiopathic versus secondary venous thromboembolism. Findings of the RIETE registry. *Rev Clin Esp.* 2014;214:357–64.
25. Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S et al. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and

Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2008;29:2276–315.

26. Kearon C, Akl EA, Comerota AJ et al. Antithrombotic therapy for VTE disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141(2 Suppl):e419S–e496S.
27. Kearon C, Akl EA, Ornelas J et al. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*. 2016;149:315–52.
28. Holst AG, Jensen G, Prescott E. Risk factors for venous thromboembolism: results from the Copenhagen City Heart Study. *Circulation*. 2010;121:1896–903.
29. Mahmoodi BK, Cushman M, Anne Næss I et al. Association of Traditional Cardiovascular Risk Factors With Venous Thromboembolism: An Individual Participant Data Meta-Analysis of Prospective Studies. *Circulation*. 2017;135:7–16.
30. Milan M, Vedovetto V, Bilora F, Pesavento R, Prandoni P. Further evidence in support of the association between venous thrombosis and atherosclerosis: a case-control study. *Thromb Res*. 2014;134:1028-31.
31. Prandoni P, Ciammaichella M, Mumoli N et al. An association between residual vein thrombosis and subclinical atherosclerosis: Cross-sectional study. *Thromb Res*. 2017; 157:16-19.
32. Prandoni P, Lensing AW, Prins MH et al. The impact of residual thrombosis on the long-term outcome of patients with deep venous thrombosis treated with conventional anticoagulation. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41:133-40
33. Poredos P, Jezovnik MK. The role of inflammation in venous thromboembolism and the link between arterial and venous thrombosis. *Int Angiol*. 2007;26:306–11.
34. Jezovnik MK, Poredos P, Lusa L. Idiopathic venous thrombosis is associated with preclinical atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17:304–11.
35. Tang EHC, Vanhoutte PM. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics*. 2008;32:409–18.
36. Yang Y-M, Huang A, Kaley G, Sun D. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H1829-1836.
37. Rodríguez-Mañas L, El-Assar M, Vallejo S et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell*. 2009;8:226–38.

38. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000;130:963–74.
39. Shi Y, Lüscher TF, Camici GG. Dual role of endothelial nitric oxide synthase in oxidized LDL-induced, p66Shc-mediated oxidative stress in cultured human endothelial cells. *PLoS ONE.* 2014;9:e107787.
40. Deng G, Long Y, Yu Y-R, Li M-R. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway. *Int J Obes (Lond).* 2010;34:165–71.
41. El-Sheakh AR, Ghoneim HA, Suddek GM, Ammar ESM. Attenuation of oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits by allicin. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;1–9.
42. Dzikowska-Diduch O, Domienik-Karłowicz J, Górka E, Demkow U, Pruszczyk P, Kostrubiec M. E-selectin and sICAM-1, biomarkers of endothelial function, predict recurrence of venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2017;157:173–80.

	N	Total N/mean (%/sd)	Unprovoked N/mean (%/sd)	Provoked N/mean (%/sd)	P
		515	325 (63.1)	190 (36.7)	
Male	515	244 (47.4)	169 (53.8)	71 (37.4)	p<0.001
Age (years)	515	63.9 (18.6)	66.1 (16.9)	59.7 (20.7)	p<0.001
Age > 75 years old	515	166 (32.2)	108 (34.4)	54 (28.4)	0.17
Man > 50 years old or woman > 60	515	367 (71.3)	239 (76.1)	118 (62.1)	p<0.01
High Blood Pressure	515	275 (53.4)	177 (56.4)	90 (47.4)	0.05
Coronary heredity	515	33 (6.4)	21 (6.7)	12 (6.3)	1
Diabetes	515	91 (17.7)	67 (21.3)	22 (11.6)	p<0.01
Dyslipidemia	515	191 (37.1)	120 (38.2)	68 (35.8)	0.63
Smoking, currently	515	95 (18.4)	61 (19.4)	34 (17.9)	0.73
Smoking, former	515	123 (23.9)	79 (25.2)	42 (22.1)	0.45
BMI (kg/m ²) BMI<25	482	144 (29.9)	93 (31.2)	49 (28.3)	0.82
25 <= BMI<30		178 (36.9)	108 (36.2)	64 (37)	
BMI >= 30		160 (33.2)	97 (32.6)	60 (34.7)	
Weight =< 50 kg	500	15 (3)	10 (3.3)	4 (2.2)	0.59
eGFR (mL/min) on admission					0.32
eGFR >= 90	515	242 (47)	139 (44.3)	99 (52.1)	
60 <= eGFR < 90		181 (35.1)	118 (37.6)	60 (31.6)	
30 <= eGFR < 60		81 (15.7)	51 (16.2)	26 (13.7)	
eGFR < 30		11 (2.1)	6 (1.9)	5 (2.6)	
Index event					0.34
DVT	515	58 (11.3)	31 (9.9)	27 (14.2)	
PE		138 (26.8)	86 (27.4)	49 (25.8)	
PE+DVT		319 (61.9)	197 (62.7)	114 (60)	
PE severity					0.19
Low-risk	457	237 (51.9)	141 (49.8)	92 (56.4)	
Intermediate low		78 (17.1)	52 (18.4)	24 (14.7)	
Intermediate high		132 (28.9)	86 (30.4)	41 (25.2)	
High risk		10 (2.2)	4 (1.4)	6 (3.7)	
DVT extension					0.13
None	515	151 (29.3)	91 (29)	57 (30)	
Distal		113 (21.9)	66 (21)	44 (23.2)	
Popliteal		67 (13)	44 (14)	21 (11.1)	
Femoral		132 (25.6)	89 (28.3)	42 (22.1)	
Iliac		52 (10.1)	24 (7.6)	26 (13.7)	
Known thrombophilia	515	21 (4.1)	12 (3.8)	9 (4.7)	0.65
Previous venous thromboembolism	515	164 (31.8)	113 (36)	46 (24.2)	p<0.01
Previous stroke	515	37 (7.2)	17 (5.4)	19 (10)	0.07
Previous Coronary artery disease	515	33 (6.4)	19 (6.1)	13 (6.8)	0.71
Previous PAD	515	16 (3.1)	11 (3.5)	5 (2.6)	0.79
Antiplatelets on admission date	515	102 (19.8)	58 (18.5)	42 (22.1)	0.36
Alocated DVT treatment					p<0.05
Rivaroxaban	515	377 (73.2)	240 (76.4)	134 (70.5)	
VKA		109 (21.2)	65 (20.7)	42 (22.1)	
Heparin		28 (5.4)	8 (2.5)	14 (7.4)	
IVC filter		1 (0.2)	1 (0.3)	0 (0)	

BMI : body mass index ; eGFR : estimated glomerular filtration rate ; DVT : deep vein thrombosis ; PE : pulmonary embolism ; PAD : peripheral arterial disease ; DOAC : direct oral anticoagulant ; VKA : vitamin K antagonists ; IVC : inferior vena cava.

Table 1: Baseline characteristics of the selected population

Cardiovascular Risk Factors	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR	CI 95%	p	OR	CI 95%	p
Age	1.94	1.31-2.88	<0.05	1.79	1.15-2.8	<0.05
HBP	1.44	1.01-2.06	<0.05	0.99	0.65-1.51	NS
Obesity	0.92	0.62-1.36	NS			
Dyslipidemia	1.11	0.76-1.62	NS	-	-	-
Diabetes mellitus	2.07	1.25-3.55	<0.05	1.82	1.07-3.18	<0.05
Smoking	1.21	0.84-1.74	NS	-	-	-
Cardiovascular heredity	1.06	0.52-2.28	NS	-	-	-
Number of cumulated cardiovascular risk factors*	OR	CI 95%	p			
1	3	1.44-6.52	<0.001	-	-	-
2	4.33	2.07-9.49	<0.001	-	-	-
≥3	4.58	2.27-9.7	<0.001	-	-	-
Thrombophilia	1.05	0.43-2.7	NS	1.06	0.42-2.77	NS

CI : confidence interval; HBP : high blood pressure; OR: odds ratio; NS: not significant.

*OR of the cumulated risk factors as compared to the absence of cardiovascular risk factors after adjustment for thrombophilia

Table 2: Unadjusted and adjusted odds ratios for unprovoked VTE in patients with an acute symptomatic event.

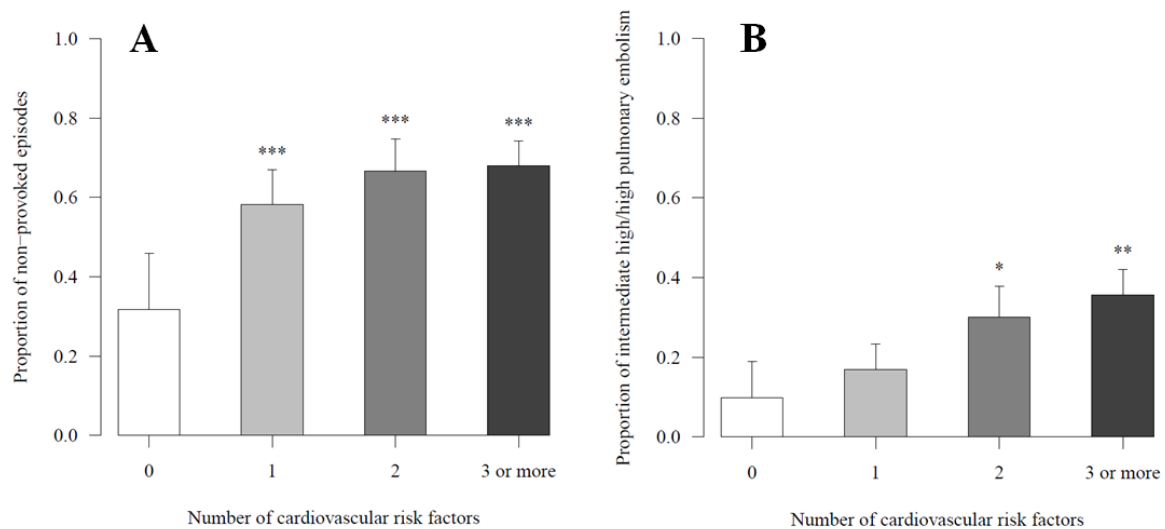


Figure 1: (A) Percentage of unprovoked VTE according to cumulative cardiovascular risk factors for atherosclerosis; **(B)** Percentage of “high-risk” and “high-risk intermediate-risk” pulmonary embolism based on cumulative cardiovascular risk factors for atherosclerosis (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

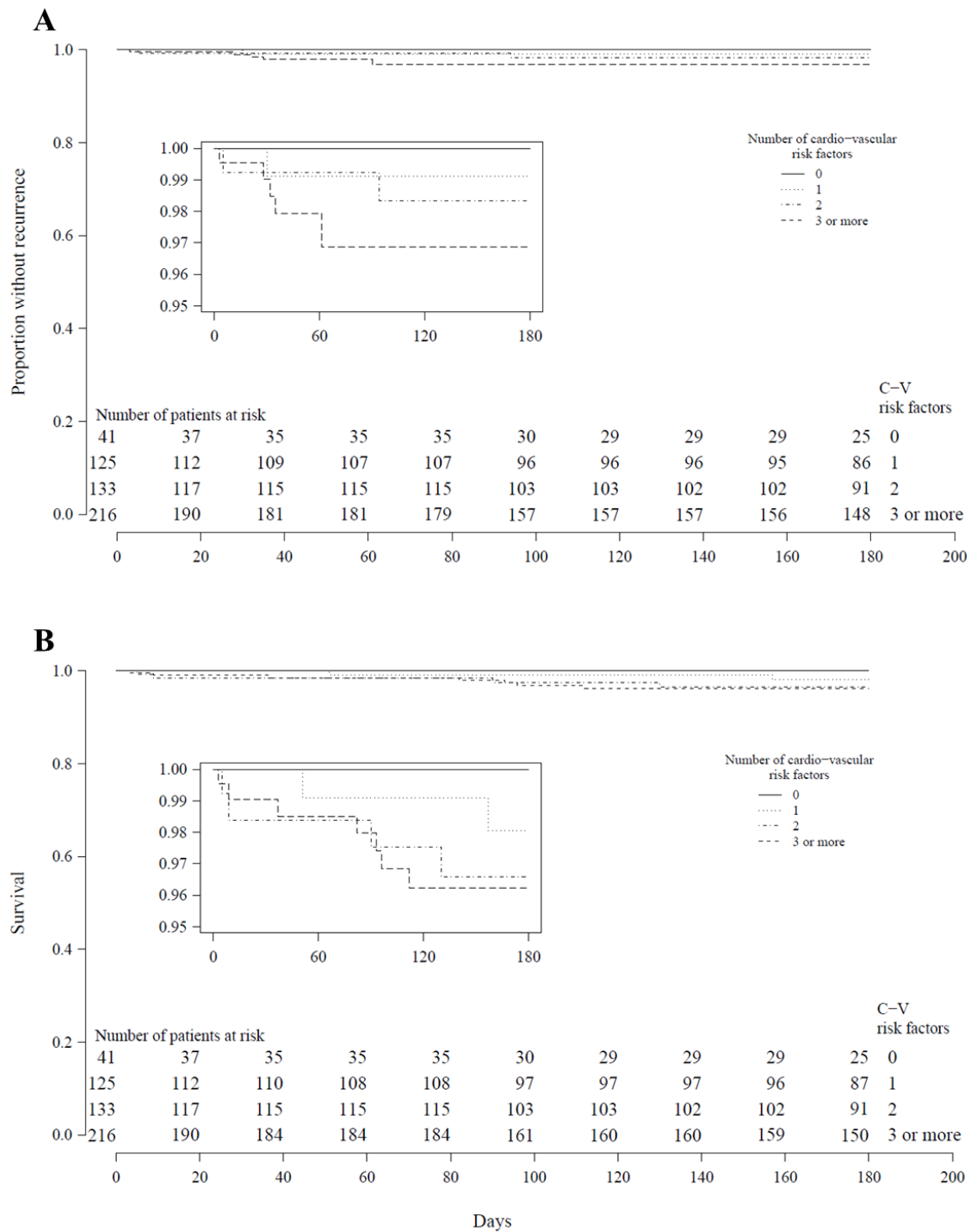


Figure 2: 6-month follow-up of the index episode of VTE (PE or DVT) **(A)** Overall survival based on cumulative cardiovascular risk factors for atherosclerosis; **(B)** VTE recurrence-free survival based on cumulative cardiovascular risk factors for atherosclerosis.

Résultats et conclusion

Les résultats de cette étude clinique nous ont montré que le risque de thrombose veineuse non provoquée est associé de manière significative au cumul des FRCV plutôt qu'au risque individuel propre à chaque FRCV, et ce, de manière indépendante de l'âge. Notre étude a également montré que le cumul des FRCV était significativement corrélé à la gravité de l'embolie pulmonaire puisque plus le cumul des FRCV est important, plus le risque de présenter une embolie pulmonaire à risque intermédiaire ou à haut risque est élevé. Nous avons par ailleurs pu montrer que le cumul des FRCV augmente le risque de mortalité toute cause et le risque de récurrence de thrombose veineuse, dans les 6 mois suivant un épisode de MVTE, alors même que le patient est sous traitement anticoagulant. Ce risque d'évènement à 6 mois augmentait graduellement avec le nombre de FRCV. Il est également important de préciser que la majorité des patients bénéficiait d'un traitement pharmacologique contre leur FRCV comme l'hypertension artérielle, le diabète ou la dyslipidémie, faisant poser la question du risque résiduel, ici de thrombose veineuse, malgré un traitement adapté et bien conduit des FRCV en sus du traitement anticoagulant.

En conclusion, notre étude a pu démontrer que le cumul des FRCV d'athérosclérose est associé à la thrombose veineuse non provoquée, à sa gravité et à sa récurrence.

Deuxième étude : Effets du vieillissement sur la fonction endothéliale vasculaire périphérique des artères et des veines fémorales chez le rat Wistar pour l'estimation du risque de thrombose veineuse lié à l'âge

Introduction

L'âge est un facteur de risque commun entre les maladies cardiovasculaires artérielles et la maladie veineuse thrombo-embolique (MVTE). Le vieillissement a des répercussions délétères sur l'endothélium vasculaire artériel en induisant une baisse de la synthèse de la prostaglandine I₂ (prostacycline), une augmentation de la thromboxane A₂ synthase, un découplage de la eNOS et la génération de facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF) notamment *via* la surexpression des cyclooxygénases (COX), en particulier la COX-1. Toutes ces modifications liées à l'âge vont augmenter le risque de développement de la maladie athéroscléreuse et le risque d'évènements athéro-thrombotiques. Nous ne savons cependant pas si ces modifications mises en évidence au niveau artériel peuvent également se rencontrer au niveau veineux pour expliquer la survenue de la MVTE.

Nous avons pu mettre en évidence dans l'étude précédente que les facteurs de risque cardiovasculaire (FRCV) majeurs d'athérosclérose étaient associés au risque de la MVTE non provoquée. Nous avons pu démontrer dans cette étude clinique chez l'homme que le cumul des FRCV, dont l'âge en fait partie, était associé de manière significative au risque de

thrombose veineuse non provoquée, plus que le risque propre à chaque FRCV. Par ailleurs, dans la littérature médicale et dans notre étude, l'âge reste un facteur de risque indépendant de thrombose veineuse non provoquée. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que le vieillissement induisait une dysfonction endothéliale veineuse périphérique, tout comme dans l'artère. Nous supposons que cette dysfonction endothéliale veineuse liée à l'âge s'accompagne de l'acquisition d'un profil pro-thrombotique dans la veine, pouvant contribuer au risque de thrombose veineuse. Dans ce travail, nous allons étudier et caractériser les mécanismes du vieillissement vasculaire chez le rat Wistar par l'analyse de la fonction endothéliale artérielle et veineuse fémorale chez le rat jeune, moyennement âgé et le rat âgé.

Activation of thromboxane prostanoid receptors mediates age-related endothelial dysfunction in the rat femoral vein: a potential mechanism increasing the risk of venous thromboembolism?

S. Gaertner ^(1,2), C. Auger ⁽¹⁾, M. A. Farooq ⁽¹⁾, B. Pollet ⁽¹⁾, J. Graaf ^(3,4), S. Khemais-Benkhiat ⁽¹⁾, L. Amoura ⁽¹⁾, S. Park ⁽¹⁾, F. Toti ⁽¹⁾, D. Stephan ⁽²⁾, N. Boehm ^(3,4,5), V. B. Schini-Kerth ⁽¹⁾.

- 1) UMR CNRS 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France;
- 2) Service d'Hypertension et Maladies Vasculaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.
- 3) Institut d'Histologie, Service Central de Microscopie Electronique, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.
- 4) Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France.
- 5) Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

Corresponding author: Dr Sébastien GAERTNER, Hypertension et maladies vasculaires,

CHRU, 1 place de l'hôpital 67091 BP 426 Strasbourg, France

Email: sebastien.gaertner@chru-strasbourg.fr

Keywords: Venous Thromboembolism, endothelial dysfunction, thromboxane prostanoid receptors

Abstract

Aging is a common risk factor for both arterial cardiovascular diseases and venous thromboembolism (VTE). Aging is related to an arterial endothelial dysfunction, but it is not known whether it is also associated with a venous endothelial dysfunction promoting the generation of prothrombotic factors leading to VTE, in particular, in the lower limb veins. This study assessed the reactivity of the femoral vein and artery endothelial function in young, middle-aged and old rats using a myograph. Vascular architecture was evaluated by histological analysis and protein localization using immunochemistry analysis. In young rats, ACh-induced relaxation of femoral vein rings was markedly inhibited by N^G-nitro-L-arginine (L-NA, eNOS inhibitor) indicating a major role of nitric oxide (NO) whereas in femoral artery rings, relaxations were partially inhibited by indomethacin (cyclooxygenase inhibitor), L-NA, and TRAM-34 plus UCL-1684 (inhibitors of endothelium-dependent hyperpolarization, EDH) indicating a role for vasorelaxant prostanoids, NO and EDH. Aging was associated with a progressive and pronounced impairment of the relaxation to ACh in femoral artery rings and to a smaller extent in femoral vein rings. Aging-related endothelial dysfunction in the femoral vein was abolished by indomethacin and S-18886 (a thromboxane prostanoid receptor antagonist) whereas in the femoral artery it was markedly improved by indomethacin and only to some extent by S-18886. Sodium nitroprusside (NO donor)-induced relaxations decreased in the femoral artery and increased in the femoral vein with aging. Immunofluorescence staining indicated a significant upregulation of COX-1 and a significant down-regulation of COX-2 with aging in the femoral artery and vein. The present findings indicate that an increased activation of TP receptors contributes to aging-related endothelial dysfunction in the femoral vein that might contribute, besides endothelial dysfunction, also to an enhanced risk of VTE with increasing age.

Introduction

Venous thromboembolism (VTE) including deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE) is the third most common cardiovascular disease after myocardial infarction and stroke (1–3). After a first episode of VTE, patients are at high risk of recurrence (4). Thus, identification of risk factors for VTE is essential not only for the prevention of a first episode but also for the prevention of its recurrence. Despite advances in the understanding of the disease, nearly 50% of VTE episodes remain unexplained without any identified risk factor (unprovoked VTE) (5). One of VTE major risk factor whether provoked or not is aging (6,7). Aging is a common risk factor for both arterial cardiovascular disease and VTE. Aging has deleterious effects on arterial endothelium and is associated with an overexpression of cyclooxygenases (COX) 1 and 2 and the generation of COX-1-derived endothelium-derived vasoconstrictor factors (EDCF), a decrease of prostacyclin synthesis, overexpression of thromboxane A₂ synthase and an uncoupling of eNOS (8–14). All of these effects will promote an increased risk of arterial thrombotic events and atherosclerotic disease in the aging population (15). However, it is not known what are the effects of aging on peripheral veins, in particular those of lower limb veins, with regard to the risk of venous thrombosis. Thus, we hypothesized that aging induces an endothelial dysfunction in the peripheral vein that might enhance the formation of thromboxane-like prothrombotic factors and, therefore, may contribute to increase the risk of VTE. Therefore, we are evaluating the endothelial function of the femoral artery and vein in young, middle-aged and old rats, and characterizing the underlying mechanism.

Methods

Ethics statement

This study conforms to the Guide of Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA ; NIH publication number 85-23, revised 1996). In accordance with the European Union laws for animal studies, all procedures were approved by the institutional ethics committee (APAFIS#10073-2017053013335510v2).

Animals

Thirty male Wistar rats were divided into three groups of ten animals each according to their age. Young rats were 3 months old, middle aged rats were 10 months old and the old rats were 18 months old.

Vascular reactivity studies

To determine the effect of aging, vascular reactivity studies were performed on femoral artery and vein after excision, carefully cleaning of connective tissue and calibrated cutting of rings (1.8 mm) in a Krebs bicarbonate solution. Rings were suspended in Halpern-Mulvany myograph (model 620M, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark) organ chambers containing oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Krebs bicarbonate solution (mM: NaCl 119, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.18, CaCl₂ 1.25, NaHCO₃ 25, and D-glucose 11, pH 7.4, 37°C) for the determination of changes in isometric tension. The femoral vein rings were stretched to 2 mN of tension whereas femoral artery rings were stretched to 3 mN of tension and then allowed

to equilibrate for 90 min. After the equilibration, Krebs bicarbonate solution was removed and the rings were immediately exposed to a Krebs bicarbonate solution containing a high concentration of potassium (80 mM) until reproducible contractile responses were obtained. After a 20 min washout period, rings were contracted with serotonin (5-HT, 1 μ M) to \sim 70% of the maximal contraction induced by the high potassium solution before addition of acetylcholine (ACh, 1 μ M) to test the endothelial function. After washout and a 20 min equilibration period, rings were again contracted with 5-HT before the construction of a concentration-relaxation curve to either ACh or sodium nitroprusside (a NO donor). In some experiments, rings were exposed to an inhibitor for 20 min before being contracted with 5-HT. To study the role of cyclooxygenase (COX)-derived vasoactive prostanoids, rings were incubated with indomethacin (10 μ M, a non-selective COX inhibitor). To study NO-mediated relaxations, rings were incubated in the presence of indomethacin and TRAM-34 plus UCL-1684 (10 μ M each, inhibitors of $I_{K_{Ca}}$ and $S_{K_{Ca}}$, respectively) to prevent the formation of vasoactive prostanoids and EDH-mediated relaxation, respectively. The EDH-mediated relaxation was studied in rings incubated with indomethacin and N^G-nitro-L-arginine (L-NA, 300 μ M, an eNOS inhibitor) to prevent the formation of vasoactive prostanoids and NO, respectively. To study the role of TP receptors, rings were incubated with S18886 (1 μ M, a selective TP receptor antagonist). Relaxations were expressed as the percentage of the reversal of the contraction to 5-HT. To study EDCFs, rings were exposed to L-NA and TRAM-34 plus UCL-1684 to prevent NO and EDH, respectively, in the absence or presence of indomethacin, before the construction of a concentration-contraction curve to ACh.

Histological analysis

To characterize femoral vessels and perivascular tissue, histological analysis was performed using hematoxylin-erythrosin staining and green Gomori trichrome staining. For this purpose, distal portion of femoral vessels surrounded with connective tissue, was placed in a 4 % paraformaldehyde (PFA) solution for later paraffin inclusion. After cutting of the femoral vessel block bands, sections (5 μm) were mounted on slides for coloring. Tissue was de-waxed and hydrated. For hematoxylin-erythrosin staining, each slide was immersed in a Groat hematoxylin bath (an equal mixture of a solution comprising 50 mL of distilled water, 1 g Iron Alum, 0.8 mL of sulfuric acid and 1 % hematoxylin solution in 96° alcohol) for 90 sec and then differentiated with running water for 2 to 3 min. After rinsing with distilled water, each slide was placed in an erythrosin bath (1 % in distilled water) for 1 min before a final rinse. After de-watering, slides were assembled. For green Gomori trichrome staining, each slide was immersed in a Groat hematoxylin bath for 90 sec and then differentiated with running water for 2 to 3 min. After rising with distilled water, each slide was placed in an acid dyes bath (2R Chromotrope 0.6 g, light green 0.3 g, phosphotungstic acid 0.7 g, acetic acid 1 mL and distilled water 100 mL) for 5min. After abundantly rinsing with distilled water and then with acetic acid followed by distilled water again, slides were dehydrated and assembled.

Immunocytochemistry study

The tissues were de-waxed following four steps: solvent bathing for 2 x 5 min, absolute alcohol for 5 min, 70 % alcohol for 5 min and distilled water for 3min. Microwave antigen unmasking was followed by overnight incubation in the primary antibody at 4°C. Primary antibodies used were rabbit polyclonal antibodies against COX-1 (1/1000, ab109025, Abcam, Paris, France) or

COX-2 (1/1000, ab15191, Abcam, Paris, France) and purified mouse monoclonal antibodies against eNOS (1/2000, cat: 610297, BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France). On the second day, tissues were rinsed with 5'PBS-Tween and endogenous peroxides were blocked with H₂O₂ for 5-10 min. Incubation with a secondary biotinylated anti-rabbit or anti-mouse antibody during 1-2 h was followed by peroxidase-labelled streptavidin complex (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Abcys, Paris, France). VIP (Vector Laboratories, Abcys, Paris, France) was used as a chromogen. Sections treated with anti-eNOS antibody were counterstained with methyl green during 1 min.

For immunofluorescence studies with different antibodies, sections were incubated with a primary antibody overnight (1/50^e dilution for antiCOX2 antibody and 1/75^e dilution for antiCOX1 antibody). Appropriate secondary antibody, anti-rabbit Alexa fluor 488 (1/100, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was used.

Statistical analysis

Values are expressed as means ± S.E.M. Statistical analysis was performed using an analysis of variance followed by the Bonferroni *post-hoc* test as appropriate using GraphPad Prism (version 5 for Microsoft windows, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Values of p<0.05 were considered to be statistically significant. Immunofluorescence was analyzed using 1051j8 version of ImageJ Software.

Results

Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in femoral artery and vein rings of young rats

In young femoral arteries rings, ACh caused pronounced relaxations amounting to about 88.44% at 10 μ M, with a moderate but significant shift of the relaxation curve to the right in the presence of the cyclooxygenase inhibitor indomethacin ($\#p < 0.05$ vs control) (Figure 1A). The addition of TRAM 34 and UCL-1684, two inhibitors of EDH, inhibited further the relaxation to ACh whereas a greater inhibitory effect was observed by the addition of L-NA, an eNOS inhibitor, indicating a major role of NO and also, to some extent, EDH and vasorelaxing prostanoids (Figure 1A). In the presence of indomethacin, L-NA plus TRAM-34 and UCL-1684, the relaxation to ACh was almost totally inhibited indicating that the relaxation involves mainly NO, EDH and prostanoids (Figure 1A). In young femoral vein rings, ACh caused concentration-dependent relaxations with a maximum relaxation of about 72,8% at 1 μ M (Figure 1B). Relaxations to ACh-induced were similar in the femoral artery and vein at 1 μ M (85,45% vs 72,8%). ACh-induced relaxations in the femoral vein were affected neither by indomethacin nor by the addition of TRAM-34 and UCL-1684 (Figure 1B). In contrast, addition of L-NA caused a pronounced inhibition of the ACh-induced relaxation indicating a predominant role of NO (Figure 1B).

Aging-related endothelial dysfunction in the femoral artery and vein

Aging was associated with a pronounced impairment of the endothelium-dependent relaxation to ACh in the femoral artery from the middle-aged and old rats (Figures 2A,B,C). The ACh-induced relaxation was significantly increased in the femoral artery of the middle-

aged group by indomethacin and only partially in the old group ($\#p < 0.05$ vs control) (Figures 2B,C). The TP receptor antagonist S18886 slightly but significantly increased the ACh-induced relaxation in the femoral artery of the middle-aged and old groups ($*p < 0.05$ vs control) (Figures 2B,C). The endothelium-dependent relaxation of the femoral vein to ACh was blunted with increasing age and this effect was totally prevented by indomethacin and S18886 ($*\#p < 0.05$ vs control) (Figures 2D,E,F).

In the presence of L-NA, TRAM-34 and UCL-1684, the addition of increasing concentrations of ACh to femoral artery rings did not affect vascular tone up to 3 μM (Figure 3A). However, a significant contraction was observed at 10 μM ACh in the young rat femoral artery compared to that of the middle-aged and old groups indicating the involvement of EDCF ($*p < 0.05$ vs middle and old aged rats). In young and middle-aged femoral vein rings, ACh-induced contractile responses at 3 μM ($p = \text{NS}$ young vs middle-aged) (Figure 3B). The endothelium-dependent contractile response was significantly greater in the old rat femoral vein than in the young and middle-aged groups (Figure 3B; $\#p < 0.05$ old vs middle-aged and young). ACh-induced contractions were abolished using indomethacin suggesting COX-dependent EDCF (supplementary figure).

In the presence of indomethacin, TRAM-34 and UCL-1684, and L-NA, sodium nitroprusside (a NO donor) induced concentration-dependent relaxations in the femoral artery, which were significantly reduced in the middle-aged and old groups compared to the young group (Figure 4A; $*\#p < 0.05$). In contrast in the femoral vein, the SNP-induced relaxation was significantly improved in the middle-aged and old groups compared to the young (Figure 4B; $*\#p < 0.05$).

Age and architecture of the femoral artery and vein

The hematoxylin-erythrosin staining of femoral artery and vein sections indicated no remodeling with age (Figure 5). Green Gomori trichrome staining did not show collagen deposition of the vascular wall with aging (Figure 5).

Age-related eNOS, COX-1 and COX-2 expression in the femoral artery and vein

Femoral vessel immunostaining with an anti-eNOS antibody exhibited an exclusive endothelial staining in the three groups of age (Figure 6). COX-1 and COX-2 staining were localized predominantly in the endothelium of both the femoral artery and the vein with aging with little staining in the media (Figure 6). In contrast, COX-1 and COX-2 staining in the aorta was observed predominantly throughout the arterial wall (Figures 6J-O). Immunofluorescence analysis confirmed the preferential endothelial localization of COX-1 and COX-2 in the femoral artery and vein compared to the aorta (Figure 7). COX-1 expression was significantly increased with aging in the femoral artery, the femoral vein and the thoracic aorta (Figure 7; #* $p < 0.05$ middle-aged or old rats vs young) while COX-2 expression was significantly down-regulated in the femoral artery and vein and in the thoracic aorta (Figure 7; *# $p < 0.05$ middle-aged or old rats vs young).

Discussion

The major finding of the present study indicates that, just like the peripheral femoral artery, the femoral vein is also affected by aging with the progressive appearance of an age-related endothelial dysfunction. The main feature of age-related venous endothelial dysfunction is that it is exclusively dependent on COXs, even at an advanced age, unlike the femoral artery.

Moreover, the venous endothelial dysfunction was secondary to the generation of vasoconstrictor prostanoids derived from the endothelium and acting exclusively on TP receptors. Activator of TP receptors have been shown to be strong inducers of platelet activation, and they have been implicated in the increased thrombotic risk at arterial sites at risk characterized by an endothelial dysfunction, thereby, promoting atherothrombosis and cardiovascular diseases (16). Although such a mechanism is well described in the arterial circulation, it remains unclear whether it contributes also to venous thrombosis.

In contrast to arterial thrombus, the venous thrombus is characterized as a platelet poor thrombus. However, it has been shown that the formation of a venous thrombus *in vivo* in mice can be reduced by the use of aspirin, a COXs inhibitor, and also by a thromboxane-prostanoid receptor antagonist, SQ29548 (17), indicating that TP receptor activation contributes to the genesis of the venous thrombosis. Thus, the present findings provide evidence that aging is accompanied by venous endothelial dysfunction associated with a potentially pro-thrombogenic profile. The possibility that such a mechanism might contribute to explain the increased incidence of venous thrombosis with increasing age is attractive but remains to be investigated (18). Such a hypothesis is supported by studies carried out in humans indicating an increased thromboxane A₂ generation during the acute phase of lower limb deep vein thrombosis as determined by the urinary excretion of TXB₂, an inactive metabolite of TXA₂ (19,20).

The present findings also indicate age-related alterations of the vascular expression level of COXs with COX-1 being significantly overexpressed predominantly in the endothelium of both femoral artery and vein with increasing age whereas COX-2 was significantly down-regulated. Thus, the TP-receptor-dependent aging-related venous endothelial dysfunction most likely

results from an increased endothelial level of COX-1 and a potential qualitative imbalance of the formation of arachidonic acid metabolites *via* the COX-1 and COX-2 pathways. An increased expression level of COX-1 and changes in arachidonic acid metabolites receptors (for example prostacyclin IP receptor, PGF2 α FP receptor...) have also been suggested to contribute to the increased age-related contractile responses to phenylephrine in rat aorta rings ; an effect markedly inhibited by a selective COX-1 inhibitor (SC560) (21).

The aging-related endothelial dysfunction in the femoral vein is associated with an increased sensitivity of the venous smooth muscle to the NO donor sodium nitroprusside, possibly indicating a compensatory effect. In contrast to the vein, the relaxation of the femoral artery smooth muscle to sodium nitroprusside was significantly impaired with aging. Further investigations are required to determine whether the aging-related increased sensitivity of the venous smooth muscle to NO is due to changes in the expression level of soluble guanylyl cyclase and/or of the underlying cyclic GMP relaxing pathway.

The present study also revealed that femoral vessels have particular characteristics regarding the localization of COX-1 and COX-2 responsible for the ageing-related endothelial dysfunction, which were both almost exclusively associated with the endothelium in both the femoral artery and vein in contrast to the aorta characterized by the staining of COX-1 and COX-2 throughout the arterial wall. These results are also surprising compared to those previously published indicating that COX-1 and COX-2 are present throughout the arterial wall in various territories such as the aorta, small arteries, pulmonary arteries or coronary arteries in pathological conditions (hypertension, diabetes, hypoxia...) in humans or in rat (22–24). Nakano and Wakabayashi (2010) showed that COX-2 is induced by the pro-inflammatory mediator interleukin-1 β in adventitial fibroblasts and macrophages in healthy rat aortas,

and increased expression level of COX-2 was observed in the vascular smooth muscle of remodeled denuded aortic strips, in whom endothelium was mechanically removed (25). These authors further indicate that inflammatory responses often contribute to upregulate COX-2 possibly via redox-sensitive pathways including the ERK signaling pathway since the stimulatory effect of interleukin-1beta was prevented by U0126, an inhibitor of extracellular signal-regulated kinases.

Taken together, these findings indicate that vascular territories are different according to the anatomical region studied and that the choice of the vessel used for an experiment is essential in the exploration of a given pathology. Thus, it seems important to study venous thrombosis-related aspects in the veins of the lower limbs and not to take the risk of transposing mechanisms from the veins of other territories such as mesenteric or jugular vein.

In conclusion, a pronounced aged-related endothelial dysfunction is observed in both femoral arteries and veins that appears as early as 6 months. In the vein, the age-related endothelial dysfunction involves predominantly vasoconstrictor prostanoids acting on TP receptors, most likely resulting from an increase in COX-1 expression and COX-2 down-regulation and an imbalance in the production of arachidonic acid metabolites. TP receptors activation is known to strongly activate platelet, suggesting that an increased activation of TP receptors might contribute, besides endothelial dysfunction, also to an enhanced risk of VTE with increasing aging.

Acknowledgments and funding

We are grateful to the Vascular Medicine French Society (Société Française de Médecine Vasculaire - SFMV) that helped fund this study by awarding research grants.

References

1. Heit JA. Epidemiology of venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol*. 2015 Aug;12(8):464–74.
2. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O’Fallon WM, Melton LJ. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med*. 2000 Mar 27;160(6):809–15.
3. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d’Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost*. 2000 May;83(5):657–60.
4. Prandoni P, Lensing AW, Cogo A, Cuppini S, Villalta S, Carta M, et al. The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med*. 1996 Jul 1;125(1):1–7.
5. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost*. 2007 Apr;5(4):692–9.
6. Anderson FA, Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, et al. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Arch Intern Med*. 1991 May;151(5):933–8.
7. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation*. 2003 Jun 17;107(23 Suppl 1):I4-8.
8. Matz RL, de Sotomayor MA, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br J Pharmacol*. 2000 Sep;131(2):303–11.
9. Tang EHC, Vanhoutte PM. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics*. 2008 Feb 19;32(3):409–18.
10. Tokunaga O, Yamada T, Fan JL, Watanabe T. Age-related decline in prostacyclin synthesis by human aortic endothelial cells. Qualitative and quantitative analysis. *Am J Pathol*. 1991 Apr;138(4):941–9.
11. Nakajima M, Hashimoto M, Wang F, Yamanaga K, Nakamura N, Uchida T, et al. Aging decreases the production of PGI₂ in rat aortic endothelial cells. *Exp Gerontol*. 1997 Dec;32(6):685–93.
12. Yang Y-M, Huang A, Kaley G, Sun D. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Nov;297(5):H1829-1836.

13. Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2001 Feb;37(2 Pt 2):529–34.
14. Rodríguez-Mañas L, El-Assar M, Vallejo S, López-Dóriga P, Solís J, Petidier R, et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell*. 2009 Jun;8(3):226–38.
15. Sepúlveda C, Palomo I, Fuentes E. Mechanisms of endothelial dysfunction during aging: Predisposition to thrombosis. *Mech Ageing Dev*. 2017 Jun;164:91–9.
16. Capra V, Bäck M, Angiolillo DJ, Cattaneo M, Sakariassen KS. Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and inflammation. *J Thromb Haemost*. 2014 Feb;12(2):126–37.
17. Tarantino E, Amadio P, Squellerio I, Porro B, Sandrini L, Turnu L, et al. Role of thromboxane-dependent platelet activation in venous thrombosis: Aspirin effects in mouse model. *Pharmacol Res*. 2016;107:415–25.
18. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O’Fallon WM, Melton LJ. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med*. 1998 Mar 23;158(6):585–93.
19. Klotz TA, Cohn LS, Zipser RD. Urinary excretion of thromboxane B2 in patients with venous thromboembolic disease. *Chest*. 1984 Mar;85(3):329–35.
20. Vesterqvist O, Gréen K, Johnsson H. Thromboxane and prostacyclin formation in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res*. 1987 Feb 15;45(4):393–402.
21. Guevara-Balcazar G, Ramirez-Sanchez I, Mera-Jimenez E, Rubio-Gayosso I, Aguilar-Najera ME, Castillo-Hernandez MC. Participation of COX-1 and COX-2 in the contractile effect of phenylephrine in prepubescent and old rats. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. 2017;21(4):407.
22. Viridis A, Bacca A, Colucci R, Duranti E, Fornai M, Materazzi G, et al. Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. *Hypertension*. 2013 Aug;62(2):337–44.
23. Feng J, Anderson K, Singh AK, Ehsan A, Mitchell H, Liu Y, et al. Diabetes Upregulation of Cyclooxygenase 2 Contributes to Altered Coronary Reactivity After Cardiac Surgery. *Ann Thorac Surg*. 2017 Aug;104(2):568–76.
24. Delannoy E, Courtois A, Freund-Michel V, Leblais V, Marthan R, Muller B. Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors. *Cardiovasc Res*. 2010 Feb 1;85(3):582–92.
25. Nakano T, Wakabayashi I. Identification of cells expressing cyclooxygenase-2 in response to interleukin-1beta in rat aortae. *J Pharmacol Sci*. 2010;113(1):84–8.

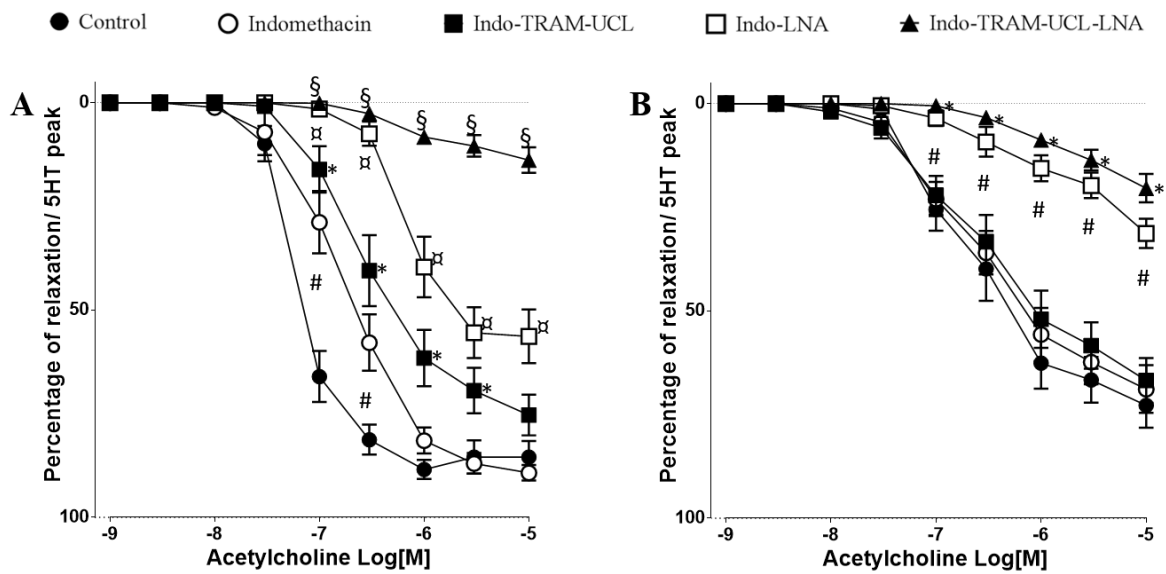


Figure 1: Endothelial function in young rat femoral artery (A) and vein (B). Femoral artery and vein rings of young rats were placed in an organ chamber Krebs bicarbonate solution (control). A concentration-relaxation curve to ACh was performed following contraction to 5-HT in the absence or presence of either indomethacin (a cyclooxygenases inhibitor). Further addition of TRAM-34 plus UCL-1684 (Indo-TRAM-UCL) or L-NA (Indo-LNA) was used to inhibit EDH or NO pathways, respectively. Indomethacin plus L-NA plus TRAM-34 and UCL-1684 (Indo-TRAM-UCL-LNA) inhibited prostanoids formation, NO and EDH. Results are expressed in percentage of relaxation as means \pm s.e.m. of ten rats per group. $p < 0.05$ were considered to be statistically significant (#* δ).

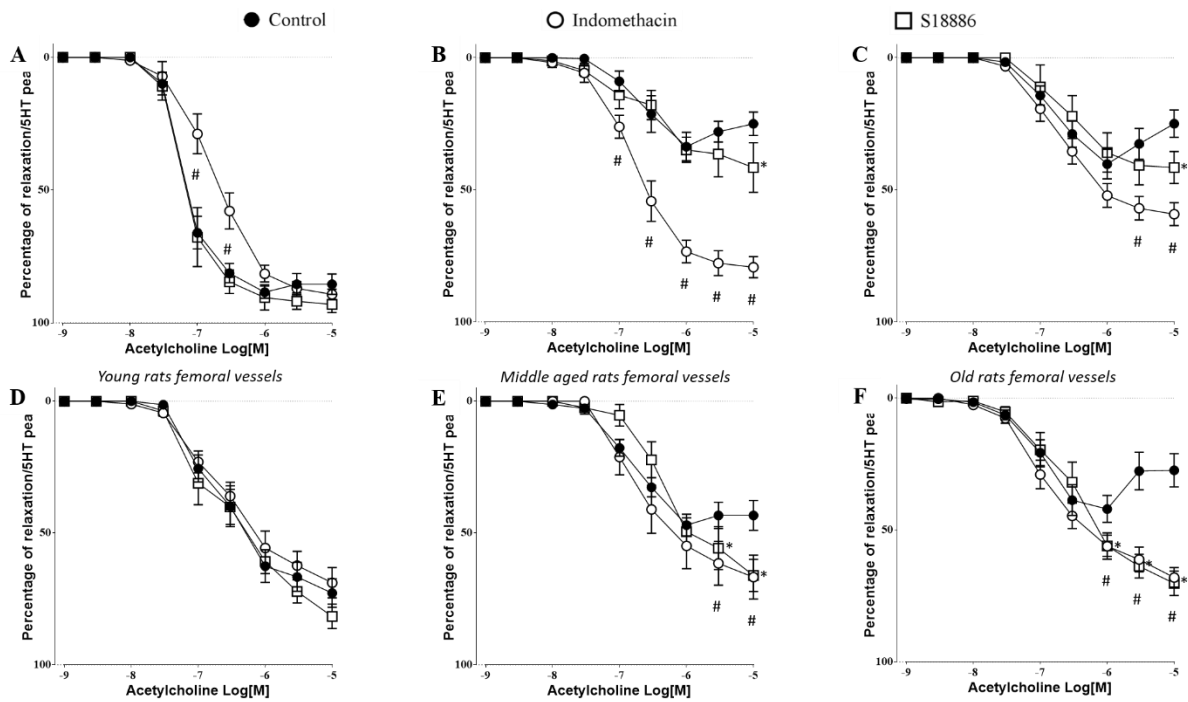


Figure 2: Effects of cyclooxygenase inhibitor indomethacin and TP receptor antagonist S18886 in femoral artery (A, B, C) and vein (D, E, F) rings of young, middle-aged and old rats. Femoral artery and vein rings of young rats were placed in an organ chamber Krebs bicarbonate solution (control). A concentration-relaxation curve to ACh was performed in the absence or presence of indomethacin or S18886 (10^{-6} M) to inhibit cyclooxygenases and TP receptors, respectively. Results are expressed in percentage of relaxation as means \pm s.e.m. of ten rats per group. $p < 0.05$ were considered to be statistically significant (#*).

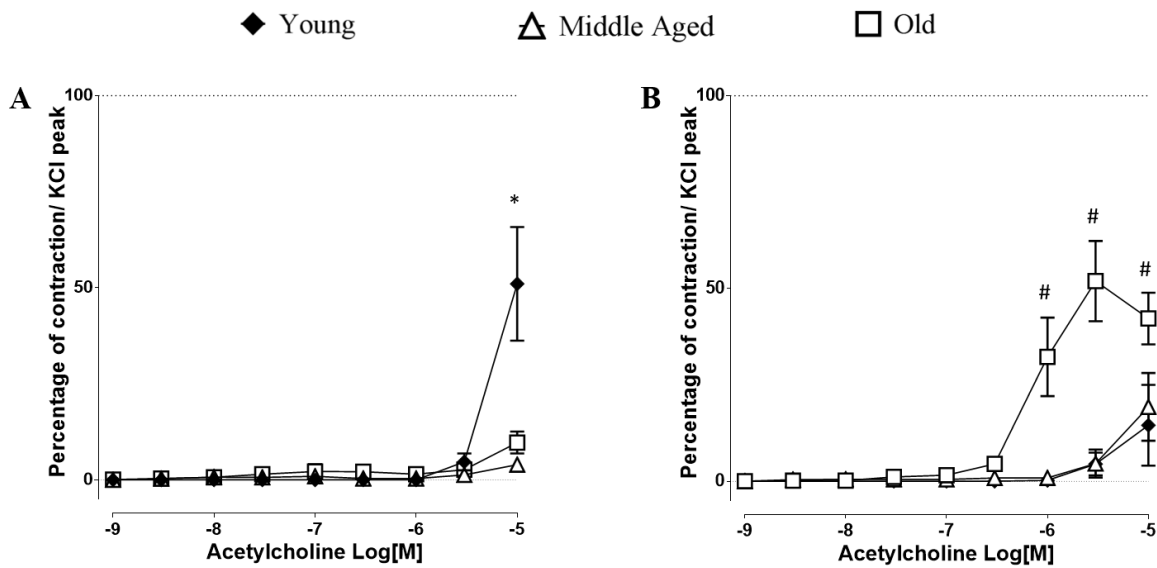


Figure 3: EDCFs generation in young rat femoral arteries (A) and veins (B) compared to middle-aged and old rats. Femoral artery or vein rings of young, middle-aged and old rats were placed in an organ chamber containing Krebs bicarbonate solution with TRAM-34, UCL-1684 and L-NA to inhibit NO and EDH pathways, respectively. A concentration-contraction curve to ACh was performed. EDCFs-induced contraction is expressed in percentage of contraction as means \pm s.e.m. of ten rats per group. $p < 0.05$ were considered to be statistically significant (#*).

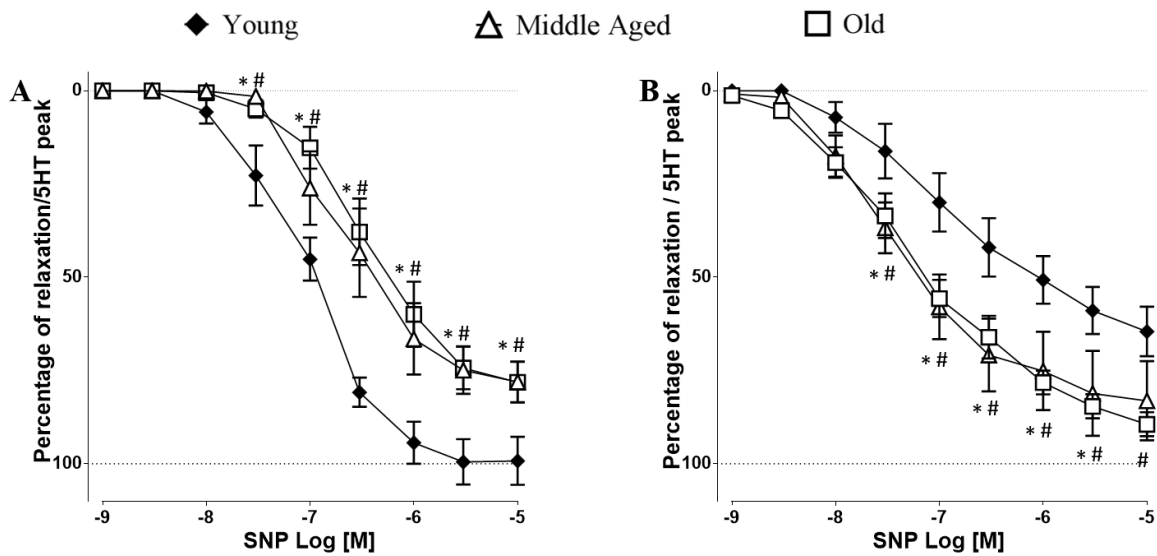


Figure 4: Sodium nitroprusside induced concentration-dependent relaxation in femoral artery (A) and vein (B) in young, middle-aged and old rats. Rings of femoral arteries and veins were incubated in organ chamber with indomethacin, TRAM-34 and UCL-1684, and L-NA to inhibit formation of vasoactive prostanoids, EDH and NO, respectively. After a 5-HT induced-contraction, a concentration-relaxation curve to SNP (NO donor) was performed. Results are expressed in percentage of contraction as means \pm s.e.m. of ten rats per group. $p < 0.05$ were considered to be statistically significant (#*).

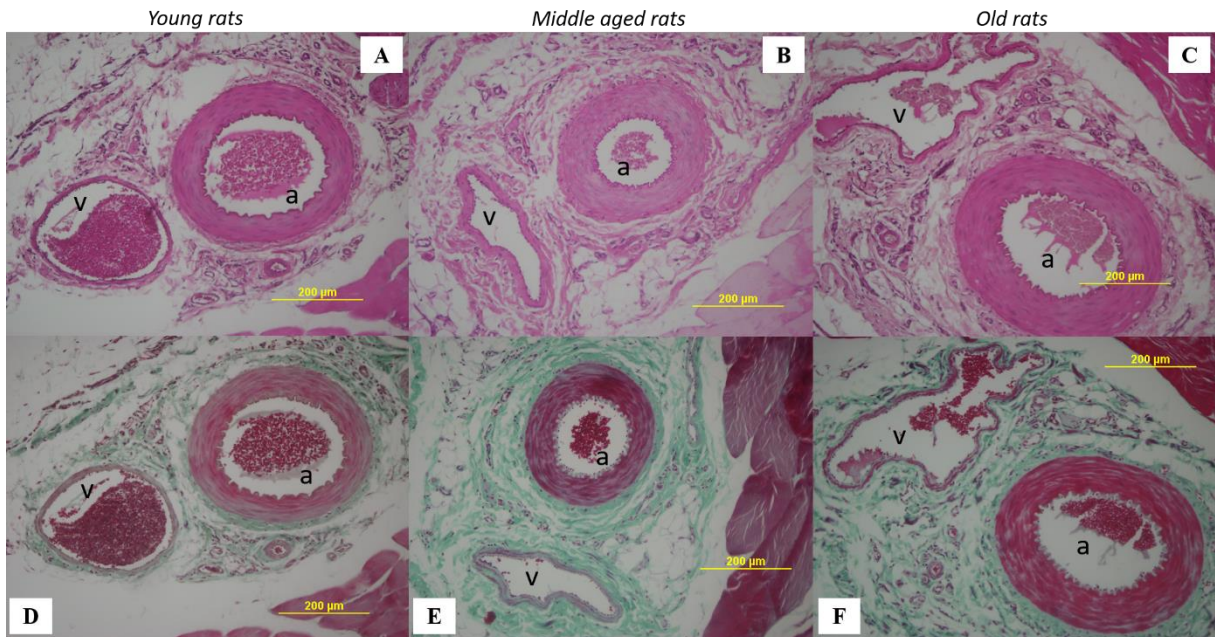


Figure 5: Representative photographs showing femoral artery (a) and femoral vein (v) histology of young, middle aged and old rats. Global age-related vascular architecture was appreciate using hematoxylin-erythrosin coloration (A, B, C). Green Gomori trichrome (D, E, F) staining were also performed to highlight muscular cells contrast of vascular media and collagen. Similar observations were made for five additional rats in each age group.

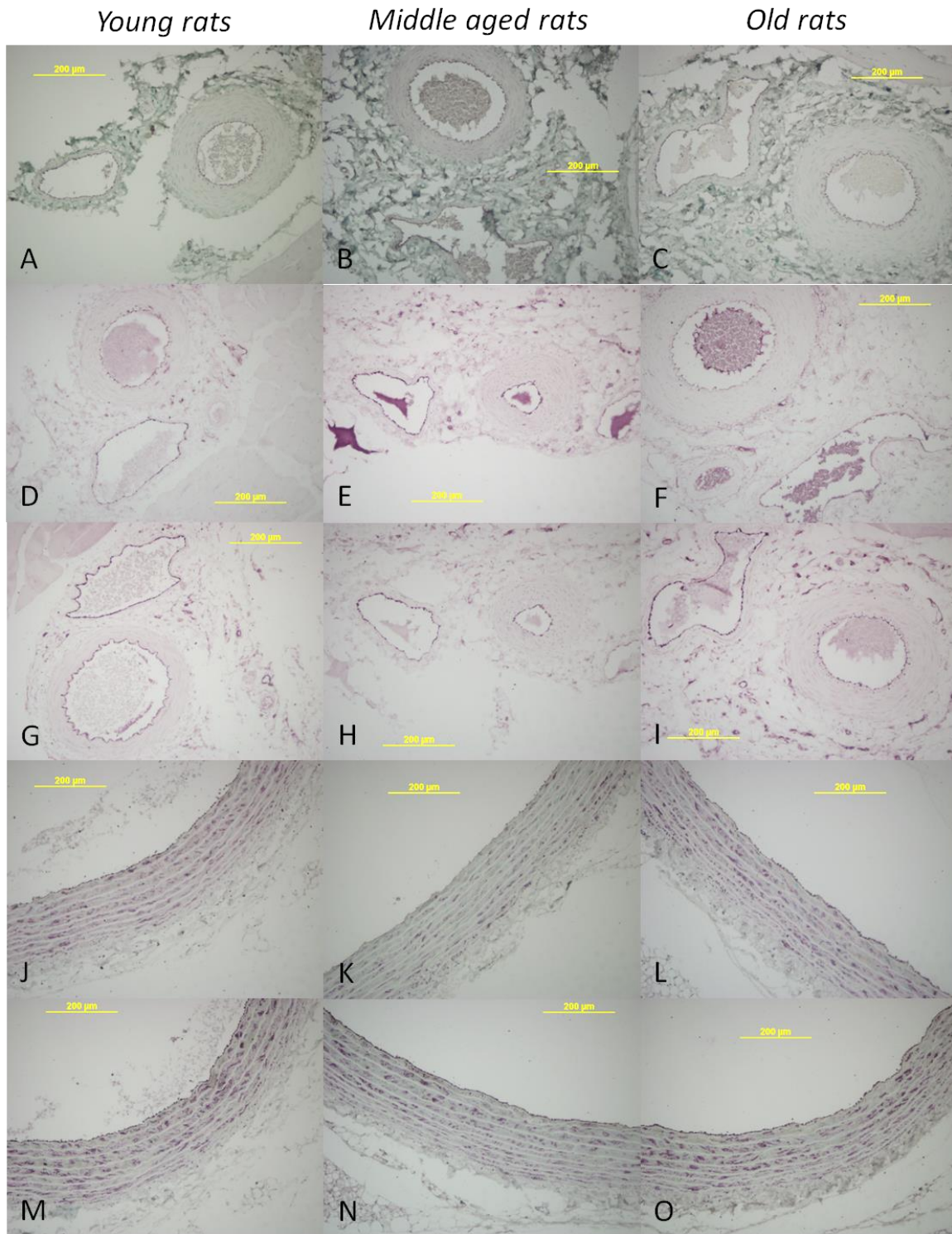


Figure 6: Representative immunocytochemistry staining of eNOS (A, B, C), COX-1 (D, E, F) and COX-2 (G, H, I) in femoral artery and vein of young, middle aged and old rats. In addition, COX-1 (J, K, L) and COX-2 (M, N, O) were also shown in thoracic aorta for comparison. Tissues were fixed in paraffin before sections of 5μm thickness preceding immunocytochemistry experiments. Similar observations were observed in four additional rats per group.

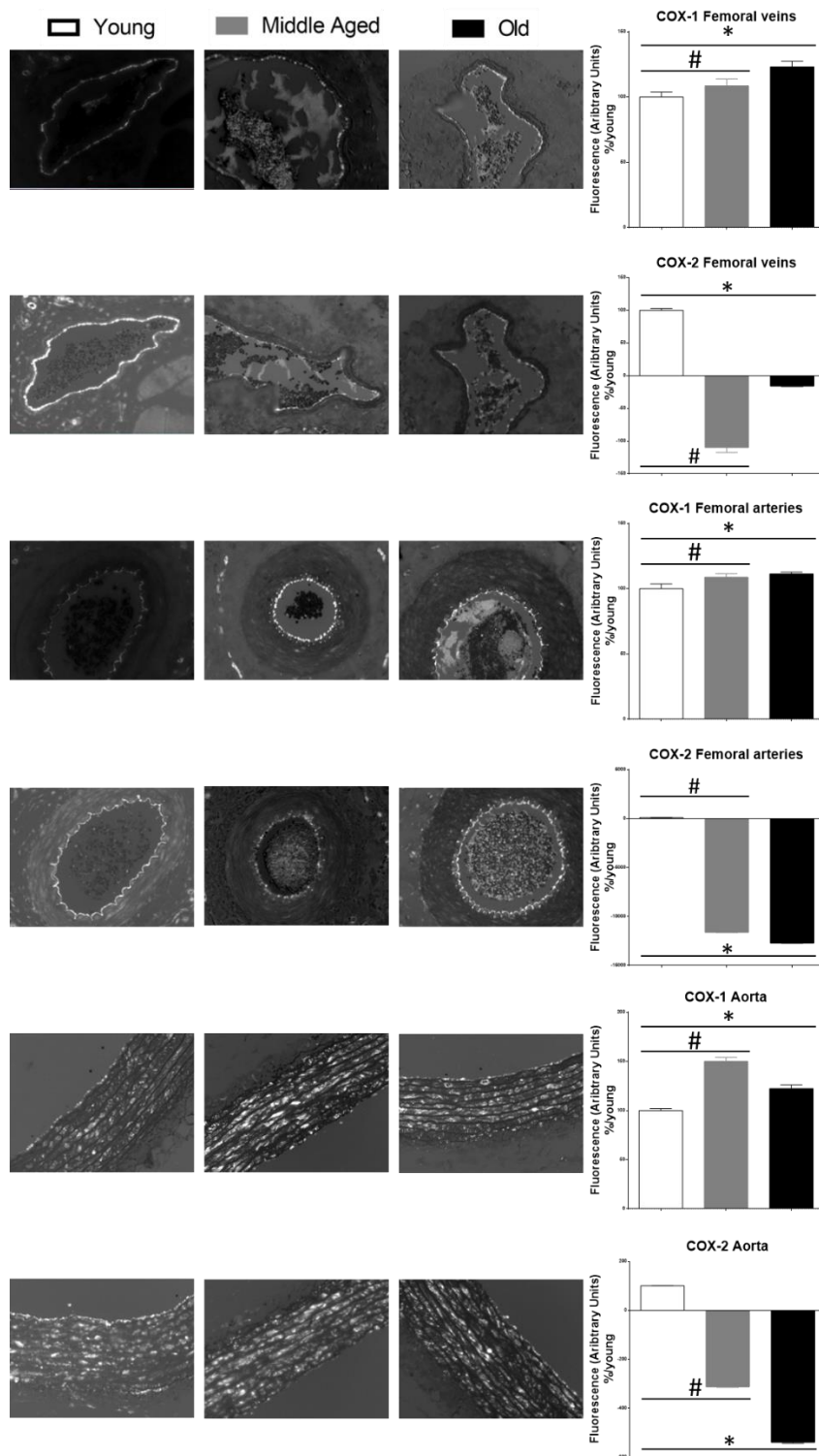
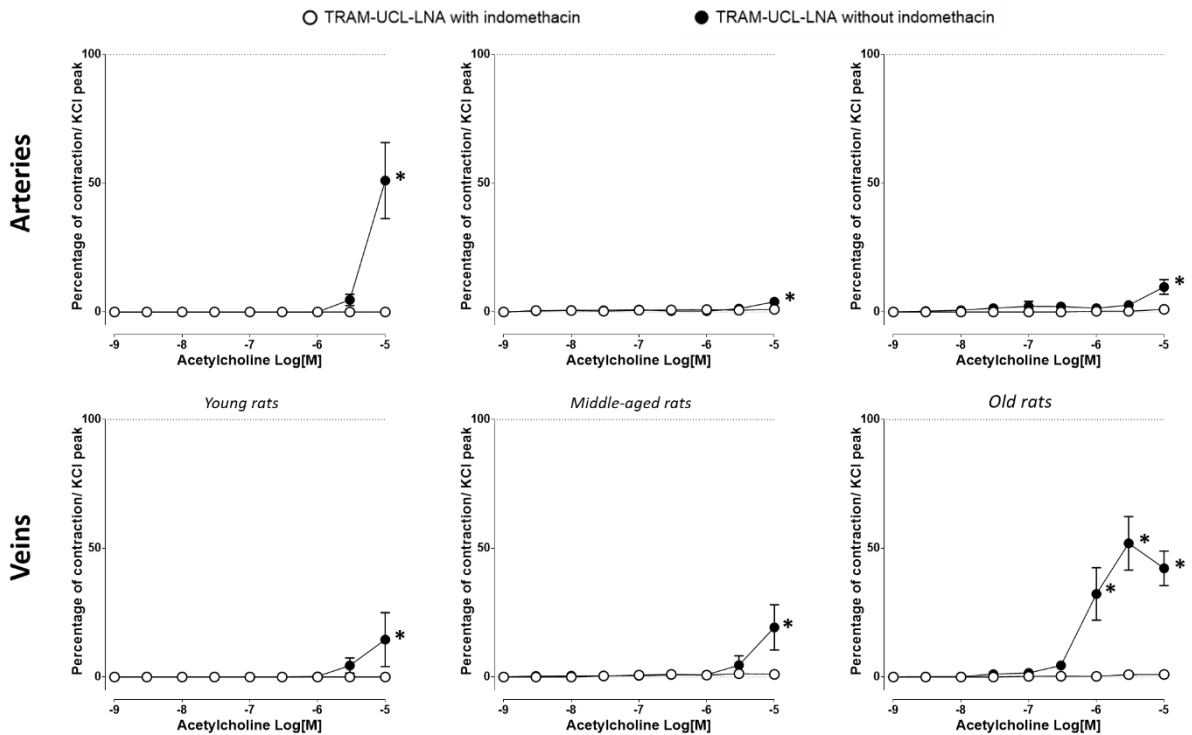


Figure 7: Representative immunofluorescence photographs of COX-1 and COX-2 in young middle-aged and old rats in femoral artery and vein and also in aorta. Tissues were fixed in paraffin before sections of 5 μ m thickness. COX-1 and COX-2 semi-quantification was determined using the expression of COX-1 and COX-2 by immunofluorescence analyzed by epifluorescence microscope. Results were expressed as means \pm s.e.m. of four to five rats per group. Young rats were considered as comparator. $p < 0.05$ were considered to be statistically significant (#*).



Supplementary figure: EDCFs generation in femoral arteries and veins in young, middle-aged and old rats, with or without indomethacin. Femoral artery or vein rings of young, middle-aged and old rats were placed in an organ chamber containing Krebs bicarbonate solution with TRAM-34, UCL-1684 and L-NA to inhibit NO and EDH pathways, respectively. A concentration-contraction curve to ACh was performed with or without indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor. EDCFs-induced contraction is expressed in percentage of contraction as means \pm s.e.m. of ten rats per group. $p < 0.05$ were considered to be statistically significant (*).

Résultats et conclusion

Dans ce travail, nous avons montré que le vieillissement induisait une dysfonction endothéliale au niveau de la veine fémorale, tout comme dans l'artère adjacente. La particularité de cette dysfonction endothéliale veineuse était d'être exclusivement COX-dépendante, quel que soit l'âge, contrairement à l'artère fémorale dans laquelle la dysfonction endothéliale revêt partiellement un caractère COX-indépendant pour les rats les plus âgés. Nous avons pu préciser que la dysfonction endothéliale veineuse était secondaire à la génération de facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium qui étaient principalement des agonistes des récepteurs TP. Les récepteurs TP sont de puissants activateurs plaquettaires et il a été montré que leur inhibition pouvait diminuer le volume d'un thrombus veineux induit expérimentalement chez la souris. Cette hypothèse a également été renforcée chez l'homme puisque la phase aiguë d'une thrombose veineuse s'accompagne de l'augmentation de la sécrétion urinaire de thromboxane B₂, un métabolite inactif du thromboxane A₂ qui est un agoniste des récepteurs TP. Ainsi, le vieillissement veineux fémoral s'accompagne de l'acquisition d'un profil prothrombotique COX-dépendant puissamment activateur plaquettaire. Contrairement à l'artère fémorale, la dysfonction endothéliale de la veine fémorale est associée à une augmentation de la sensibilité des cellules musculaires lisses de la média au NO, reflétant possiblement un mécanisme de compensation. Cette possible adaptation fonctionnelle est également à corrélérer à la modification de l'équilibre des COX avec le vieillissement puisque nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression de COX-1 et au contraire une diminution significative de COX-2 avec l'âge dans les vaisseaux fémoraux.

Enfin, nos travaux ont mis en évidence une particularité de la localisation des cyclooxygénases dans la paroi vasculaire fémorale puisque, que ce soit dans l'artère ou dans la veine fémorale, les COX sont quasi exclusivement localisées dans l'endothélium contrairement à ce qui est connu d'autres vaisseaux comme l'aorte, où les COX sont localisées dans l'ensemble de la paroi vasculaire. Cette différence est capitale dans l'étude et l'interprétation des mécanismes conduisant à une pathologie donnée et souligne bien l'importance du choix du modèle animal et du vaisseau à étudier lorsqu'il s'agit de transposer les informations issues de l'expérimentation animale à l'homme.

En conclusion, le vieillissement fémoral s'accompagne d'une dysfonction endothéliale artérielle et veineuse précoce chez le rat Wistar. La dysfonction endothéliale veineuse associée à l'âge est liée à la génération accrue de facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium activateurs des récepteurs TP, COX-dépendants, issus d'un déséquilibre de l'expression des COX avec une augmentation de l'expression de COX-1 et une diminution de l'expression de COX-2. Cette dysfonction endothéliale veineuse ayant ainsi un profil pro-activateur plaquettaire suggère une augmentation du risque de thrombose veineuse liée au vieillissement.

Troisième étude : caractérisation de la fonction endothéliale de l'artère et de la veine fémorale chez le rat ZSF1 jeune, un modèle de syndrome métabolique, pour l'estimation du risque de thrombose veineuse associée au cumul des facteurs de risque cardiovasculaires majeurs d'athérosclérose.

Introduction

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une association entre les facteurs de risque cardiovasculaire (FRCV) majeurs d'athérosclérose et le risque de thrombose veineuse non provoquée. Nous avons montré dans notre propre étude clinique, à partir de patients hospitalisés pour un épisode aigu de maladie veineuse thromboembolique (MVTE) inclus dans le registre REMOTEV, qu'il existe bien un lien entre les FRCV et le risque de MVTE non provoquée. Ce lien ne reposait pas sur le risque individuel propre à chaque FRCV mais sur la pression exercée par leur cumul, notamment chez les patients porteurs d'un syndrome métabolique. L'enjeu de l'identification des mécanismes physiopathologiques pouvant expliquer ce lien entre FRCV artériels d'athérosclérose et risque de thrombose veineuse est capital, puisque cela permettrait de mieux identifier les patients à risque d'un premier épisode de MVTE mais aussi ceux à risque de récurrence. Au-delà de l'identification d'un individu à risque, la compréhension de ces mécanismes permettrait peut-être d'envisager l'utilisation d'autres traitements pharmacologiques, voire de développer de nouvelles pistes thérapeutiques, en

dehors du traitement anticoagulant qui est parfois pris en défaut pour la prévention de la récurrence de MVTE mais surtout exposant le patient à un risque hémorragique.

Après avoir montré le lien clinique FRCV-MVTE chez l'homme et après avoir montré que le vieillissement de la veine fémorale chez le rat Wistar s'accompagnait de l'acquisition d'un profil pro-thrombotique, il semblait important de savoir si le cumul des FRCV au niveau de la veine fémorale d'un rat jeune pouvait également induire une dysfonction endothéliale veineuse et présenter un profil pro-thrombotique. Cela permettrait de d'apporter une preuve du risque de thrombose veineuse exercé par le cumul des FRCV, indépendamment de l'âge. Ainsi, dans cette étude, nous avons analysé la fonction endothéliale de la veine fémorale comparativement à l'artère fémorale chez le rat ZFS1 jeune (issu du croisement entre le rat ZDF et SHHF), qui a la particularité de développer un syndrome métabolique après une diète d'induction associant obésité, hypertension, diabète de type II et dyslipidémie. Nous avons également cherché à identifier les mécanismes pouvant expliquer le rôle pro-thrombotique de la veine fémorale soumise à l'action délétère du cumul des FRCV.

Venous endothelial dysfunction and vascular premature aging in young ZSF1 rats: key role of cyclooxygenases and potential risk for venous thrombosis induced by cumulative cardiovascular risk factors for atherosclerosis

S. Gaertner ^(1,2), C. Auger ⁽¹⁾, M. A. Farooq ⁽¹⁾, B. Pollet ⁽¹⁾, J. Graaf ^(3,4), S. Khemais-Benkhiat ⁽¹⁾, L. Amoura ⁽¹⁾, S. Park ⁽¹⁾, F. Toti ⁽¹⁾, D. Stephan ⁽²⁾, N. Boehm ^(3,4,5), V. B. Schini-Kerth ⁽¹⁾.

- 1) UMR CNRS 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France
- 2) Service d'Hypertension et Maladies Vasculaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France
- 3) Institut d'Histologie, Service Central de Microscopie Electronique, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France
- 4) Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France.
- 5) Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Corresponding author:

Sébastien GAERTNER, MD

Hypertension et maladies vasculaires, CHRU

1 place de l'hôpital 67091 BP 426 Strasbourg, France

Email: sebastien.gaertner@chru-strasbourg.fr

Keywords: Venous Thromboembolism, endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors, cyclooxygenases, metabolic syndrome

Abstract

Cardiovascular risk factors (CVRF) for atherosclerosis have been associated with unprovoked venous thromboembolism (VTE) in some epidemiological studies but the link remains unclear regarding individual risk factors. Studies converge towards a strong epidemiological link with the metabolic syndrome, cumulating major CVRF, but the underlying mechanism is unknown. This study examined whether CVRF accumulation in ZSF1 rat, a metabolic syndrome model, promotes venous endothelial dysfunction leading to a prothrombotic condition in the femoral vein compared to the femoral artery. Obese ZSF1 rats presented a severe endothelial dysfunction in femoral veins with reduced acetylcholine-induced relaxations of femoral vein rings and the induction of pronounced endothelium-dependent contractile factors (EDCF) responses which were exclusively cyclooxygenase(COX)-dependent compared to femoral artery. COX-dependent and COX-independent endothelial dysfunction was observed in femoral artery. COX-mediated endothelial dysfunction involved differently COX-1 and COX-2 considering femoral artery or vein. With CVRF burden, COX-1 was not implicated in arterial endothelial dysfunction whereas COX-2 was protective. In femoral vein, both COX-1 and COX-2 were associated with endothelial dysfunction leading to EDCF. COX-1 and COX-2 inhibition restored complete endothelial function in femoral vein. Femoral vein architecture was conserved in histological analysis and immunocytochemistry showed a particular almost exclusive endothelial localization of COX-1 and COX-2. Immunofluorescence assays showed that COX-1 was significantly overexpressed in obese ZSF1 rats aorta and downregulated in femoral artery and vein whereas COX-2 was significantly downregulated in femoral vessels and aorta, compared to lean ZSF1 rats. Our results suggest that CVRF induced a venous endothelial dysfunction involving a COX-dependent process different from artery and that

vascular territories do not share same underlying mechanisms. Both COX-1 and COX-2 are deleterious in femoral vein despite COX-2 downregulation suggesting that CVRF exerts pressure on arachidonic acid pathway leading to adverse prostanoids. This venous CVRF-dependent EDCF could participate to thrombus formation explaining in part the link between CVRF and VTE.

Introduction

Venous thromboembolic disease including deep vein thrombosis and pulmonary embolism is the third most common cardiovascular disease (1–3). Its gravity lies in the fatal risk linked to pulmonary embolism but also to the heavy consequence secondary to post-thrombotic syndrome following deep vein thrombosis (4–8). The clinical challenge lies in preventing the disease and its recurrence by identifying the risk factors whether inherited or acquired, that may require an extended anticoagulant therapy for better vascular protection (9–11). Despite knowledge about risk factors for venous thrombosis, more than half of the episodes remain unprovoked (12). It is therefore essential to identify new risk factors for thrombosis for better management of the disease and a better understanding of the physiopathological mechanisms. Recently, epidemiological studies have identified a relationship between cardiovascular risk factors (CVRF) for atherosclerosis (age, hypertension, diabetes, obesity, dyslipidemia) and the risk of unprovoked venous thrombosis (13,14). Although such a relationship is debated for individual CVRF, a strong relationship is observed with the accumulation of major CVRF for atherosclerosis in the metabolic syndrome (15,16). Indeed, metabolic syndrome is associated with an increase of about 2-fold of unprovoked venous thrombosis (17). Such a concept is also consistent with the fact that in patients with venous thrombosis an increase in subclinical atherosclerosis has been observed (13,18). CVRF have been associated with endothelial dysfunction, oxidative stress and perivascular inflammation in the artery, promoting the development of major cardiovascular diseases (19–23). On the other hand, the impact of CVRF on peripheral veins, in particular the lower limbs veins, remains unknown. The aim of this study is to evaluate the effect of cumulative CVRF on the femoral vein in the ZSF1 rat, an experimental model of metabolic syndrome that accumulates

obesity, hypertension, type 2 diabetes and dyslipidemia. The possibility that CVRF in the ZSF1 rat is associated with an endothelial dysfunction of the femoral vein and the induction of a prothrombotic state is compared to that of the adjacent femoral artery.

Methods

Ethics statement

This study conforms to the Guide of Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA; NIH publication number 85-23, revised 1996). In accordance with the European Union laws for animal studies, all procedures were approved by the institutional ethics committee (APAFIS#10073-2017053013335510v2).

Animal Groups

Seven male ZSF1 obese rats (*ZSF1-Lepr^{fa}Lepr^{cp}/Crl*) and seven ZSF1 lean rats (control) with the same genetic background were studied (Charles River Laboratories, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). Rats, 12-weeks of age, were given an induction diet (Diet-Induced Obesity, Charles River Laboratories, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France) up to 20-weeks of age to develop the pathological profile of obese rats. Ten young Wistar rats, aged from 16 to 20 weeks, were used also as a control group to evaluate the effect of the ZSF1 lean genetic background.

Vascular reactivity studies

To determine the effect of cumulative CVRF on femoral artery and femoral vein, vascular reactivity studies were performed on femoral vessels after vascular excision, carefully connective tissue cleaning and calibrated rings cutting (1,8 mm) in a Krebs bicarbonate solution. Rings were suspended in organ chambers containing oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Krebs bicarbonate solution (mM: NaCl 119; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,18; CaCl₂ 1,25; NaHCO₃ 25; and D-glucose 11; pH 7,4; 37°C) for the determination of changes in isometric tension using a Halpern-Mulvany myograph (model 620M, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark). The femoral vein rings were stretched to 2 mN of tension and the femoral artery rings were stretched to 3 mN of tension and then allowed to equilibrate for 90 min. After the equilibration, Krebs bicarbonate solution was removed and the rings were immediately exposed to a Krebs bicarbonate solution containing a high concentration of potassium (80 mM) until reproducible contractile responses were obtained. After a 20 min washout period with return of the rings to a steady state, the rings were contracted with serotonin (5-HT, 1 μM) to ~ 70 % of the maximal contraction induced by the high potassium solution before addition of acetylcholine (ACh, 1 μM) to test the endothelial function. After washout and a 20 min equilibration period, rings were again contracted with 5-HT before the construction of a concentration-relaxation curve to either ACh or sodium nitroprusside (a NO donor). In some experiments, rings were exposed to an inhibitor for 20 min before being contracted with 5-HT. To study the role of cyclooxygenases, rings were incubated with either indomethacin (10 μM, a non-selective COX inhibitor), NS398 (3 μM, a selective COX-1 inhibitor) or SC560 (0.3 μM, a selective COX-2 inhibitor). To study NO-mediated relaxations, rings were incubated in the presence of indomethacin and TRAM-34 plus UCL-1684 (10 μM each, Inhibitors of IK_{Ca} and SK_{Ca}, respectively) to prevent the formation of vasoactive prostanoids and EDH-mediated

relaxation, respectively. The EDH-mediated relaxation was studied in rings incubated with indomethacin and N^G-nitro-L-arginine (L-NA, 300 μM, an eNOS inhibitor) to prevent the formation of vasoactive prostanoids and NO, respectively. Relaxations were expressed as the percentage of the reversal of the contraction to 5-HT. To study endothelium-dependent vasoconstrictor factors (EDCFs), rings were exposed to L-NA and TRAM-34 plus UCL-1684 to prevent the formation of NO and EDH, respectively, with or without indomethacin before the construction of a concentration-contraction curve to ACh.

Histological analysis

To characterize femoral vessels and perivascular tissue, histological analysis was performed using hematoxylin-erythrosin staining and green Gomori trichrome staining. For this purpose, the distal portion of femoral vessels surrounded by connective tissue, was placed in a 4% paraformaldehyde (PFA) solution for later paraffin inclusion. After cutting of the femoral vessel block bands, sections (5 μm) were mounted on slides for subsequent staining. Tissue was de-waxed and hydrated. For hematoxylin-erythrosin staining, each slide was immersed in a Groat hematoxylin bath (an equal mixture of a solution comprising 50 mL of distilled water, 1 g Iron Alum, 0,8 mL of sulfuric acid and 1 % hematoxylin solution in 96° alcohol) for 90 sec and then differentiated with running water for 2 to 3 min. After rinsing with distilled water, each slide was placed in an erythrosin bath (1 % in distilled water) for 1 min before being rinsed again. After de-watering, slides were assembled. For green Gomori trichrome staining, each slide was immersed in a Groat hematoxylin bath for 90 sec and then differentiated with running water for 2 to 3 min. After rinsing with distilled water, each slide was placed in an acid dyes bath (2R Chromotrope 0,6g; light green 0,3g; phosphotungstic acid 0,7g; acetic acid 1 mL

and distilled water 100 mL) for 5 min. After abundantly rinsing with distilled water followed by acetic acid and then with distilled water again, slides were dehydrated and assembled.

Immunocytochemistry study

The sections were de-waxed following four steps: solvent bathing for 2 x 5 min, absolute alcohol for 5 min, 70 % alcohol for 5 min and distilled water for 3 min. Microwave antigen unmasking was followed by overnight incubation in the primary antibody at 4°C. Primary antibodies used were rabbit polyclonal antibodies against COX-1 (1/1000, ab109025, Abcam, Paris, France) or COX-2 (1/1000, ab15191, Abcam, Paris, France) and purified mouse monoclonal antibody against eNOS (1/2000, cat: 610297, BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France). On the second day, sections were rinsed with 5'PBS-Tween and endogenous peroxides were blocked with H₂O₂ for 5-10 min. Incubation with a secondary biotinylated anti-rabbit or anti-mouse antibody during 1 -2 h was followed by incubation with a peroxidase-labelled streptavidin complex (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Abcys, Paris, France). VIP (Vector Laboratories, Abcys, Paris, France) was used as a chromogen. Sections treated with anti-eNOS antibody and aorta sections were counterstained with methyl green during 1 min.

For immunofluorescence studies with different antibodies, sections were incubated with the primary antibody overnight (1/50^e dilution for antiCOX-2 antibody, 1/75^e dilution for antiCOX-1 antibody and 1/100^e dilution for eNOS antibody). Appropriate secondary antibody, anti-rabbit Alexa fluor 488 or anti-mouse Alexa fluor 488 (1/100, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was used.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using an analysis of variance followed by the Bonferroni *post-hoc* test as appropriate using GraphPad Prism (version 5 for Microsoft windows, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Values of $p < 0,05$ were considered to be statistically significant.

Results

ACh-induced relaxations in the femoral artery and vein of young lean ZSF1 and Wistar rats

In femoral artery rings of young lean ZSF1, ACh induced a concentration-dependent relaxation amounting to about 64.70% at 1 μ M (Figure 1B). The relaxation to ACh was less pronounced than that of the femoral artery of young Wistar rats, which amounted to about 88.4% at 1 μ M (Figure 1A). Furthermore, in the femoral artery of young lean ZSF1, the blunted relaxation to ACh was associated with the appearance of contractile responses at concentrations greater than 1 μ M whereas no such effect was observed in the femoral artery of young Wistar (Figure 1B). Indomethacin, a non-selective cyclooxygenase inhibitor, markedly improved relaxations in the femoral artery of lean ZSF1 rats (relaxations amounted to 78.34% at 10 μ M ACh, # $p < 0,05$ vs control). In the presence of indomethacin, the addition of TRAM 34 and UCL-1684, two inhibitors of EDH, did not affect relaxations to ACh in the femoral artery of lean ZSF1 rats whereas the addition of N^G-nitro-L-arginine (an eNOS inhibitor) abolished the relaxation, indicating a major role of NO but not of EDH (* $p < 0.05$ vs control, Figure 1B). In the femoral artery of young Wistar rats, indomethacin slightly but significantly inhibited the relaxation to ACh, which was further inhibited by the addition of TRAM-34 plus UCL-1684, and to a greater extent by L-NA (Figure 1A).

In the femoral vein of lean ZSF1, although the relaxation to ACh was similar (about 65.9% at 10 μ M) to that of the femoral vein of young Wistar rats (about 72.8% at 10 μ M), it was associated with the induction of slight but significant contractile responses at concentrations greater than 0,3 to 10 μ M, which were abolished by indomethacin (relaxations amounted to about 72.96%, #p<0.05, Figures 1D,E). ACh-induced relaxations in the femoral vein of young Wistar rats were not significantly affected by indomethacin in the absence or presence of TRAM-34 and UCL-1684 (p=NS vs control) but markedly inhibited by L-NA (Figure 1D). In the femoral vein of lean ZSF1 rats, indomethacin slightly but significantly improved relaxations to ACh (relaxations amounted to about 72.96%, #p<0.05, Figure 1E) and, to some extent further by the addition of TRAM-34 plus UCL-1684 (relaxations amounted to about 86,64 %, *p<0.05, Figure 1E). In contrast, the addition of L-NA to indomethacin significantly switched the relaxation curve to ACh to the right without affecting the maximal relaxation at 1 μ M ACh (Figure 1E). Taken together, these findings indicate that NO predominantly accounts for the ACh-induced relaxation in the femoral vein of young Wistar and, to a lesser extent, in the lean ZSF1 rats.

ACh-induced relaxation in the femoral artery and vein of obese ZSF1 cumulating cardiovascular risk factors

In the femoral artery of ZSF1 rats, ACh-induced relaxations were blunted compared to those of the lean ZSF1 rats and characterized by the appearance of contractile responses at concentrations greater than 1 μ M (Figure 1C). ACh-induced contractile responses were abolished by indomethacin, whereas the further addition of TRAM-34 plus UCL-1684 had no effect and L-NA markedly reduced the relaxations (Figure 1C).

In the femoral vein of obese ZSF1 rats, ACh-induced relaxations were markedly blunted with the appearance of pronounced contractile responses at concentrations greater than 0.1 μM (Figure 1F). Similarly to the lean ZSF1, indomethacin markedly improved relaxations to ACh in the femoral vein of obese ZSF1 rats and this effect was not affected by the subsequent addition of TRAM-34 and UCL-1684 and reduced, to some extent, by the addition of L-NA ($\alpha p < 0.05$, Figure 1F).

Role of COX-1 and COX-2 in the endothelial dysfunction of the femoral artery and vein in the lean and obese ZSF1 rats

In the femoral artery of lean ZSF1, the selective COX-1 inhibition by SC560 significantly restored relaxations to ACh to a similar extent as indomethacin whereas the selective COX-2 NS398 had no such an effect (Figure 2A). In the femoral artery of obese ZSF1, relaxations to ACh were slightly but not significantly improved by SC560 whereas NS398 induced significant impairment of relaxation (Figure 2B).

In the femoral vein of lean ZSF1, ACh-induced relaxations were not significantly affected by the COX-1 inhibitor whereas they were improved by the COX-2 inhibitor ($*p < 0.05$, Figure 2C).

In the femoral vein of obese ZSF1 and in contrast to indomethacin, both the COX-1 inhibitor and the COX-2 inhibitor did not significantly affect relaxations to ACh (Figure 2D).

EDCF in the femoral artery and vein of lean and obese ZSF1 rats

In the femoral artery exposed to L-NA, and TRAM-34 and UCL-1684 to prevent the formation of NO and EDH, increasing concentrations of ACh induced contractile responses at concentrations of or greater than 0,3 μM in the lean ZSF1 and 1 μM in the obese ZSF1 rat (Figure 3A). Endothelium-dependent contractile responses to ACh were greater in the lean

than the obese ZSF1 rat at 10 μ M ACh (Figure 3A) (* p <0,05). In femoral vein exposed to L-NA, and TRAM-34 and UCL-1684, ACh induced similar contractile responses at concentrations greater than 0,3 μ M ACh in the lean and obese ZSF1 rats (Figure 3B).

Sodium nitroprusside-induced relaxations in the femoral artery and vein of lean and obese ZSF1 rats

In the presence of indomethacin, TRAM-34 and UCL-1684 and L-NA to inhibit the formation of prostanoids, EDH, and NO, sodium nitroprusside (a NO donor) induced similar relaxations in both the lean and the obese ZSF1 rats, which were significantly smaller than those in Wistar rats (* p <0.05, Figure 4A). In the femoral vein, sodium nitroprusside-induced relaxations were similar in both the lean and obese ZSF1 rat and they were greater than those observed in Wistar rats (* p <0.05, Figure 4B).

ZSF1 rat femoral vascular architecture

Hematoxylin-erythrosin staining of 5 μ m femoral vessels sections showed the absence of remodeling of the media of obese ZSF1 compared to lean ZSF1 rats (Figures 5A,B). Green Gomori trichrome staining did not reveal collagen infiltration of the wall of the femoral artery and vein in the lean and obese ZSF1 (Figures 5C,D).

Immunohistochemical staining of eNOS, COX-1 and COX-2 in the femoral artery and vein of lean and obese ZSF1 rats

Femoral vessel immunostaining with an anti-eNOS antibody indicated an exclusive endothelial staining in the both groups of ZSF1 rats (Figures 5E,F). In addition, both COX-1 and COX-2 staining was predominantly limited to the endothelium with little staining in the media in both

the femoral artery and vein of lean and obese ZSF1 rats (Figures 5G-J). In contrast, both COX-1 and COX-2 immunostaining in the aorta revealed their presence throughout the arterial wall (Figures 5K-N).

Immunofluorescence analyses confirmed the almost exclusive endothelial localization of COX-1 and COX-2 in the femoral artery and vein compared to the aorta (Figure 6) in which COX expression was observed throughout the media and the endothelium. Compared to lean ZSF1 rat, both COX-1 and COX-2 immunofluorescent signals were significantly reduced in the femoral artery and vein of obese ZSF1 compared to lean ZSF1 rats (* $p < 0.05$, Figure 6).

Discussion

Although the lean ZSF1 rat has a genetic background predisposing for arterial and venous endothelial dysfunction, the present findings indicate that cardiovascular risk factors accumulation in obese ZSF1 rats worsened the femoral artery endothelial dysfunction with a dual contribution of COX-dependent and independent mechanisms, and severely aggravated the femoral vein endothelial dysfunction with a predominantly COX-dependent mechanism. With cardiovascular risk factors burden, we have shown that COX-1 and COX-2 did not lead to the same effect on femoral vasoreactivity suggesting that the generated prostanoids had not the same profile. Indeed, in the lean ZSF1 femoral artery COX-1 was associated with endothelial dysfunction since its inhibition allowed to ACh-induced fully relaxation whereas COX-2 inhibition didn't modify relaxation suggesting that COX-2 was not implied in endothelial dysfunction mechanism. This profile was modified under the effect of CVRF since in obese ZSF1 rats, COX-1 inhibition did not modify significantly ACh-induced relaxation while COX-2 appeared protective since COX-2 inhibition worsened endothelial dysfunction with EDCF

generation. These findings suggest that COX-2 leads to the generation of vasodilator prostanoids in vascular stress situation conferred by CVRF clustering. We have shown that COX-2 reacts similarly during aging with a protective effect on the femoral artery in previous work since its inhibition in middle-aged rat vasoreactivity experiments was accompanied by a worsened endothelial function impairment in concentration-dependent relaxation to ACh and by EDCF generation. One of the mechanisms of this protection and the decreased risk of thrombosis may be a decrease in platelet adhesion to the endothelium (24). The protective effect conferred by COX-2 on arteries has already been suspected in humans since the anti-inflammatory treatment with a selective COX-2 inhibitor, celecoxib, was accompanied by an increased risk of cardiovascular events, especially myocardial infarction (25,26). COX-2 also protects against endothelial apoptosis secondary to modifiable CVRF like smoking (27). This protective profile of COX-2 in the arteries has also been shown in a vasoreactivity preclinical study in coronary arteries of diabetic patients where bradykinin-mediated coronary artery relaxation was impaired by selective inhibition of COX-2, thus suggesting COX-2 participation in arterial relaxation induced by bradykinin (28). In contrast to their study which showed an increase in COX-2 expression under the influence of diabetes in the coronary arteries, we found instead a significantly decrease in the expression of protective COX-2 in the femoral artery. This decrease in expression may explain in part the endothelial dysfunction found in the femoral artery which underlines its particularity. Indeed, femoral artery does not appear to have the same COX expression pattern as other arteries under the influence of certain factors. Moreover, the purely endothelial localization of COX involved in femoral vasoreactivity is a specificity that we have not found in other arterial vessels, highlighting that vascular territories are not equivalent and that the choice of the vessel in a model of human pathology in animals is essential (28–30). COX-1 showed that it was accompanied by a

vasoconstrictor response in the carotid arteries during acetylcholine-induced relaxation as in our study in femoral artery (31). These results for COX-1 and COX-2 in arteries are not transposable to the femoral vein. The femoral vein does not seem to share the same mechanisms of endothelial function, especially in dysfunctional situations, with respect to the artery. Indeed, if we have shown that relaxation of the femoral vein was mainly related to NO with cumulative CVRF, the vein response to the CVRF differs from the artery since the SNP-independent endothelium relaxation is enhanced, possibly reflecting an increase in smooth muscle sensitivity to NO in the femoral vein in pathological conditions. Venous endothelium is poorly studied and little data are available on venous endothelial function alteration and the role of COX in this dysfunction, especially in relation to CVRF. It has however been shown by Bishop-Bailey et al. that venous smooth muscle cells release more prostaglandins and express more COX-2 than arteries (32). The same authors revealed the absence of negative feedback of the inhibition of COX-2 expression in the vein unlike the artery, thus highlighting a big difference in the mechanism of induction of COX-2 in the vein. This endothelial dysfunction secondary to COX-2 is accompanied by an important generation of EDCF under CVRF burden in synergy with deleterious effects of COX-1. Racz et al. showed that in hyperhomocysteinemia, a thrombophilic situation, COX-2 production was increased as thromboxane A₂ (TXA₂) generation leading to vasoconstriction in skeletal muscle venules that may promote thrombus formation (33). In our work, COX-2 expression decreased in the femoral vein but it seems that COX-2 amount is not important but the arachidonic acid metabolism pathway that would change under the CVRF deleterious effects for a larger generation of prothrombogenic prostanoids such as TXA₂.

In conclusion, we showed that ZSF1 young rat exhibited significant arterial and venous femoral dysfunction with purely COX-dependent endothelial dysfunction in the vein accompanied by

a large generation of EDCF. This deleterious profile of the venous endothelium could favor the formation of a venous thrombus under certain conditions. This may be one of the possible mechanisms for the link between cumulative CVRF for atherosclerosis and the risk of unprovoked venous thrombosis found in humans' epidemiological studies.

Acknowledgments and funding

We are grateful to the Vascular Medicine French Society (Société Française de Médecine Vasculaire - SFMV) that helped fund this study by awarding research grants.

References

1. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, Danchin N, Fitzmaurice D, Galiè N, et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 14 nov 2014;35(43):3033-3069, 3069a-3069k.
2. Tagalakis V, Patenaude V, Kahn SR, Suissa S. Incidence of and mortality from venous thromboembolism in a real-world population: the Q-VTE Study Cohort. *Am J Med*. sept 2013;126(9):832.e13-21.
3. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation*. 17 juin 2003;107(23 Suppl 1):I4-8.
4. Serhal M, Haddadin IS, Heresi GA, Hornacek DA, Shishehbor MH, Bartholomew JR. Pulmonary embolism response teams. *J Thromb Thrombolysis*. juill 2017;44(1):19-29.
5. Giordano NJ, Jansson PS, Young MN, Hagan KA, Kabrhel C. Epidemiology, Pathophysiology, Stratification, and Natural History of Pulmonary Embolism. *Tech Vasc Interv Radiol*. sept 2017;20(3):135-40.
6. Pikovsky O, Rabinovich A. Prevention and treatment of the post-thrombotic syndrome. *Thromb Res*. 15 juill 2017;
7. Kahn SR. The post-thrombotic syndrome. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2 déc 2016;2016(1):413-8.
8. Rabinovich A, Kahn SR. The postthrombotic syndrome: current evidence and future challenges. *J Thromb Haemost JTH*. févr 2017;15(2):230-41.
9. Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. *Lancet Lond Engl*. 16 août 2003;362(9383):523-6.
10. Kyrle PA, Rosendaal FR, Eichinger S. Risk assessment for recurrent venous thrombosis. *Lancet Lond Engl*. 11 déc 2010;376(9757):2032-9.
11. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, Blaivas A, Jimenez D, Bounameaux H, et al. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*. févr 2016;149(2):315-52.
12. Kearon C, Ageno W, Cannegieter SC, Cosmi B, Geersing G-J, Kyrle PA, et al. Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: guidance from the SSC of ISTH. *J Thromb Haemost JTH*. juill 2016;14(7):1480-3.
13. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, Bernardi E, Petrobelli F, Lensing AWA, et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med*. 10 avr 2003;348(15):1435-41.

14. Ageno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. *Circulation*. 1 janv 2008;117(1):93-102.
15. Ageno W, Prandoni P, Romualdi E, Ghirarduzzi A, Dentali F, Pesavento R, et al. The metabolic syndrome and the risk of venous thrombosis: a case-control study. *J Thromb Haemost JTH*. sept 2006;4(9):1914-8.
16. Dentali F, di Minno MN, Gianni M, di Minno G, Squizzato A, Ageno W. The role of the metabolic syndrome in patients with provoked venous thromboembolic events. *Thromb Haemost*. avr 2013;109(4):759-61.
17. Ageno W, Di Minno MND, Ay C, Jang MJ, Hansen J-B, Steffen LM, et al. Association between the metabolic syndrome, its individual components, and unprovoked venous thromboembolism: results of a patient-level meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. nov 2014;34(11):2478-85.
18. Reich LM, Folsom AR, Key NS, Boland LL, Heckbert SR, Rosamond WD, et al. Prospective study of subclinical atherosclerosis as a risk factor for venous thromboembolism. *J Thromb Haemost JTH*. sept 2006;4(9):1909-13.
19. Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto GK, Oliveira HT, et al. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol*. sept 2011;44(9):920-32.
20. Godo S, Shimokawa H. Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. sept 2017;37(9):e108-14.
21. Incalza MA, D’Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 1 juin 2017;
22. Boulanger CM. Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. avr 2016;36(4):e26-31.
23. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. mai 2016;248:97-109.
24. Buerkle MA, Lehrer S, Sohn H-Y, Conzen P, Pohl U, Krötz F. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles in vivo. *Circulation*. 5 oct 2004;110(14):2053-9.
25. De Vecchis R, Baldi C, Di Biase G, Ariano C, Cioppa C, Giasi A, et al. Cardiovascular risk associated with celecoxib or etoricoxib: a meta-analysis of randomized controlled trials which adopted comparison with placebo or naproxen. *Minerva Cardioangiol*. déc 2014;62(6):437-48.
26. Chen L-C, Ashcroft DM. Risk of myocardial infarction associated with selective COX-2 inhibitors: meta-analysis of randomised controlled trials. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. juill 2007;16(7):762-72.

27. Shi Z, Chen Y, Pei Y, Long Y, Liu C, Cao J, et al. The role of cyclooxygenase-2 in the protection against apoptosis in vascular endothelial cells induced by cigarette smoking. *J Thorac Dis.* janv 2017;9(1):30-41.
28. Feng J, Anderson K, Singh AK, Ehsan A, Mitchell H, Liu Y, et al. Diabetes Upregulation of Cyclooxygenase 2 Contributes to Altered Coronary Reactivity After Cardiac Surgery. *Ann Thorac Surg.* août 2017;104(2):568-76.
29. Viridis A, Bacca A, Colucci R, Duranti E, Fornai M, Materazzi G, et al. Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. *Hypertens Dallas Tex 1979.* août 2013;62(2):337-44.
30. Delannoy E, Courtois A, Freund-Michel V, Leblais V, Marthan R, Muller B. Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors. *Cardiovasc Res.* 1 févr 2010;85(3):582-92.
31. Liu B, Li Z, Zhang Y, Luo W, Zhang J, Li H, et al. Vasomotor Reaction to Cyclooxygenase-1-Mediated Prostacyclin Synthesis in Carotid Arteries from Two-Kidney-One-Clip Hypertensive Mice. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136738.
32. Bishop-Bailey D, Pepper JR, Larkin SW, Mitchell JA. Differential induction of cyclooxygenase-2 in human arterial and venous smooth muscle: role of endogenous prostanoids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* oct 1998;18(10):1655-61.
33. Racz A, Veresh Z, Lotz G, Bagi Z, Koller A. Cyclooxygenase-2 derived thromboxane A(2) and reactive oxygen species mediate flow-induced constrictions of venules in hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis.* janv 2010;208(1):43-9.

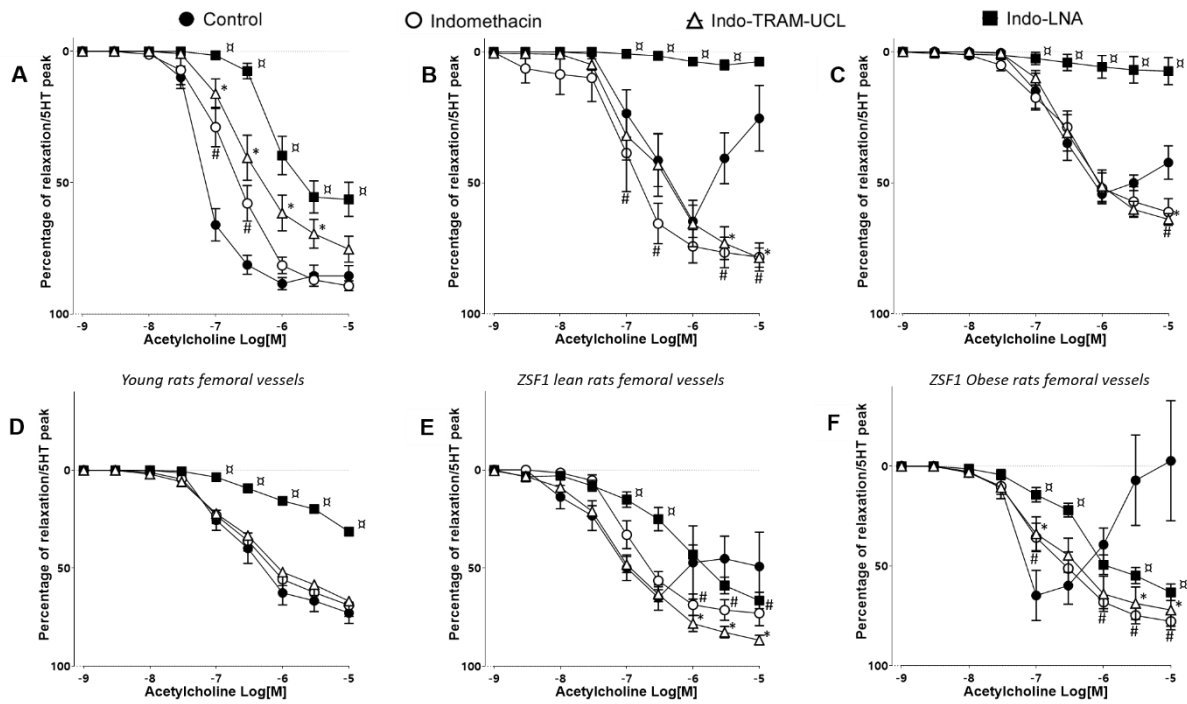


Figure 1: Endothelial function in young ZSF1 rats femoral artery (B,C) and vein (E,F) compared to young Wistar rat femoral artery (A) and vein (D). Femoral artery and vein rings of young Wistar, lean and obese ZSF1 rats were placed in an organ chamber Krebs bicarbonate solution (control). A concentration-relaxation curve to ACh was performed. Adjunction of indomethacin inhibited cyclooxygenases. Further addition of TRAM-34 plus UCL-1684 (Indo-TRAM-UCL) or L-NA (Indo-LNA) inhibited EDH or NO pathways, respectively. Results are expressed in percentage of relaxation as means \pm s.e.m. of seven rats per group. $p < 0.05$ were considered to be statistically significant (#* α).

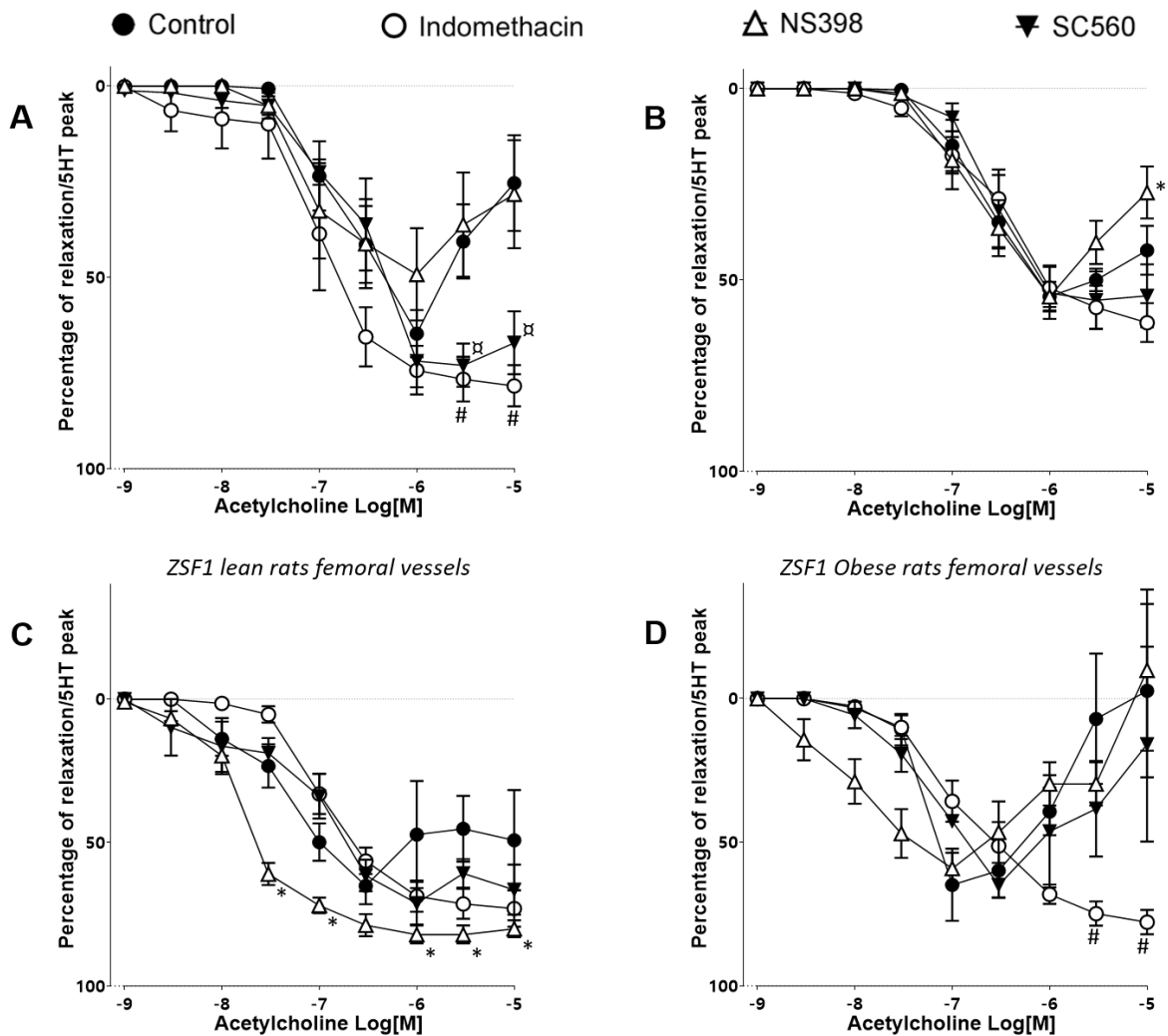


Figure 2: Effects of COX-1 and COX-2 selective inhibition in acetylcholine-induced relaxation in lean and obese ZSF1 femoral artery (A,B) and vein (C,D). Femoral artery and vein rings of young lean (A,C) or obese (B,D) ZSF1 rats were placed in an organ chamber Krebs bicarbonate solution (control). A concentration-relaxation curve to ACh was performed. Adjunction of indomethacin, used as comparator, inhibited both COX-1 and COX-2 cyclooxygenases. COX-1 selective inhibition was performed using SC560 and COX-2 selective inhibition using NS398. Results are expressed in percentage of relaxation as means \pm s.e.m. of seven rats per group. $p < 0.05$ were considered to be statistically significant (*# α).

Lean TRAM-UCL-LNA
 Obese TRAM-UCL-LNA
 Lean Indo-TRAM-UCL-LNA
 Obese Indo-TRAM-UCL-LNA

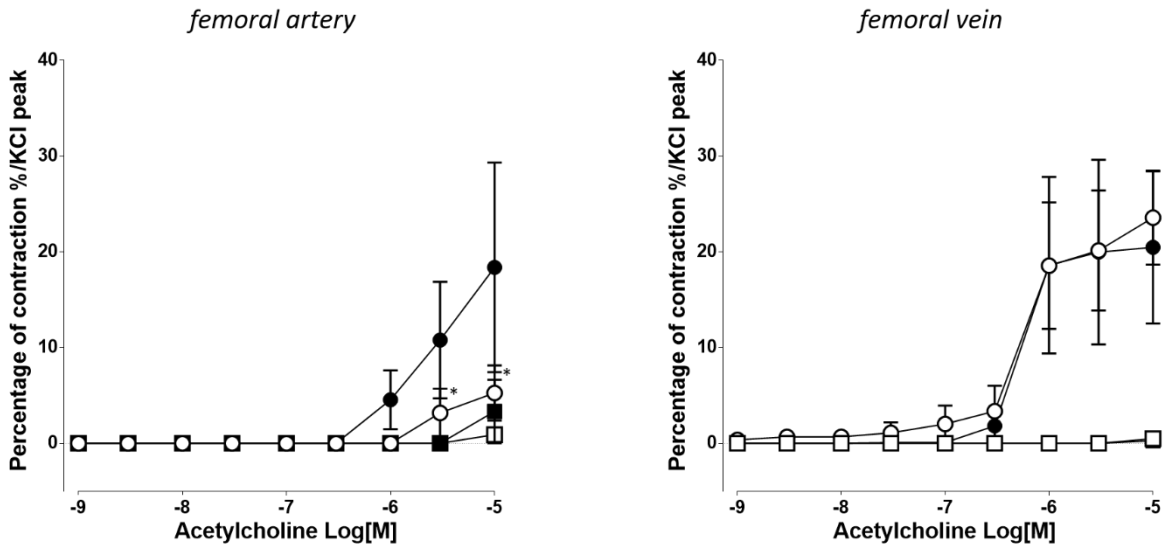


Figure 3: EDCFs generation in young ZSF1 femoral arteries (A) and vein (B) comparing lean to obese rats. Femoral vessels rings of lean and obese ZSF1 rats were placed in an organ chamber Krebs bicarbonate solution with TRAM-34, UCL1684 and L-NA to inhibit NO and EDH pathways with or without indomethacin. A concentration-contraction curve to ACh was performed. EDCFs-induced contraction is expressed in percentage of contraction as means \pm s.e.m. of ten rats per group. $p < 0.05$ were considered to be statistically significant (*#).

● Young Wistar Kyoto rats

□ ZSF1 Lean rats

■ ZSF1 Obese rats

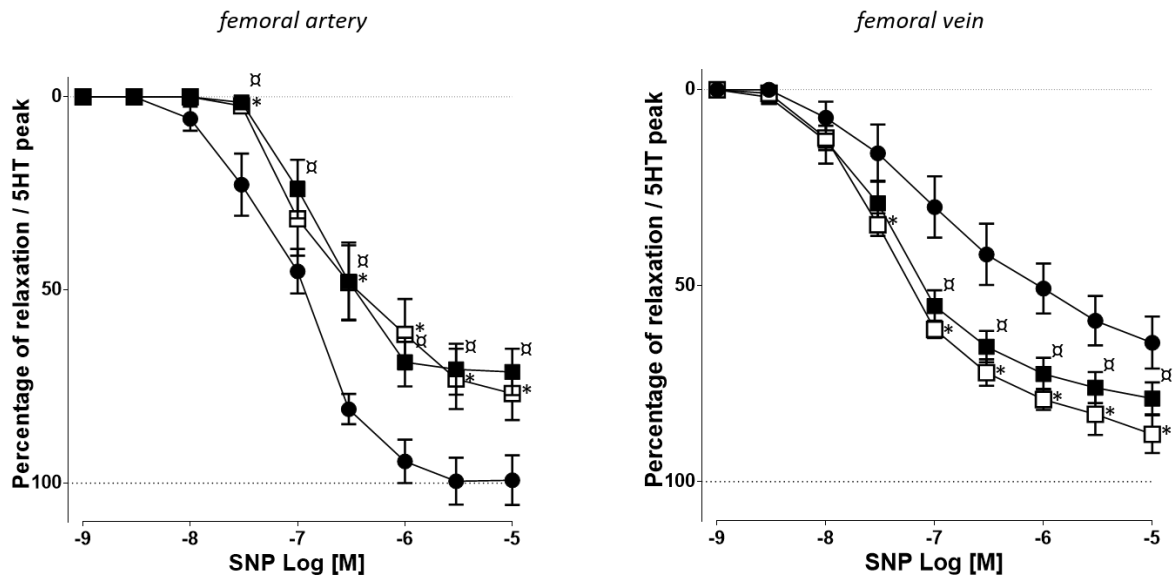


Figure 4: Sodium nitroprusside induced concentration-dependent relaxation in femoral artery (A) and vein (B) in young lean and obese ZSF1 rats compared to young Wistar rats. Rings of femoral arteries and veins were incubated in organ chamber with inhibitors so that endothelium-induced relaxation was inhibited (Indomethacin plus TRAM-34 and UCL-1684 plus L-NA to inhibit formation of prostanoids vasoactive agents, EDH and NO, respectively). After a 5-HT induced-contraction, a concentration-relaxation curve to SNP (NO donor) was performed. Results are expressed in percentage of contraction as means \pm s.e.m. of seven rats per group. $p < 0.05$ were considered to be statistically significant (*).

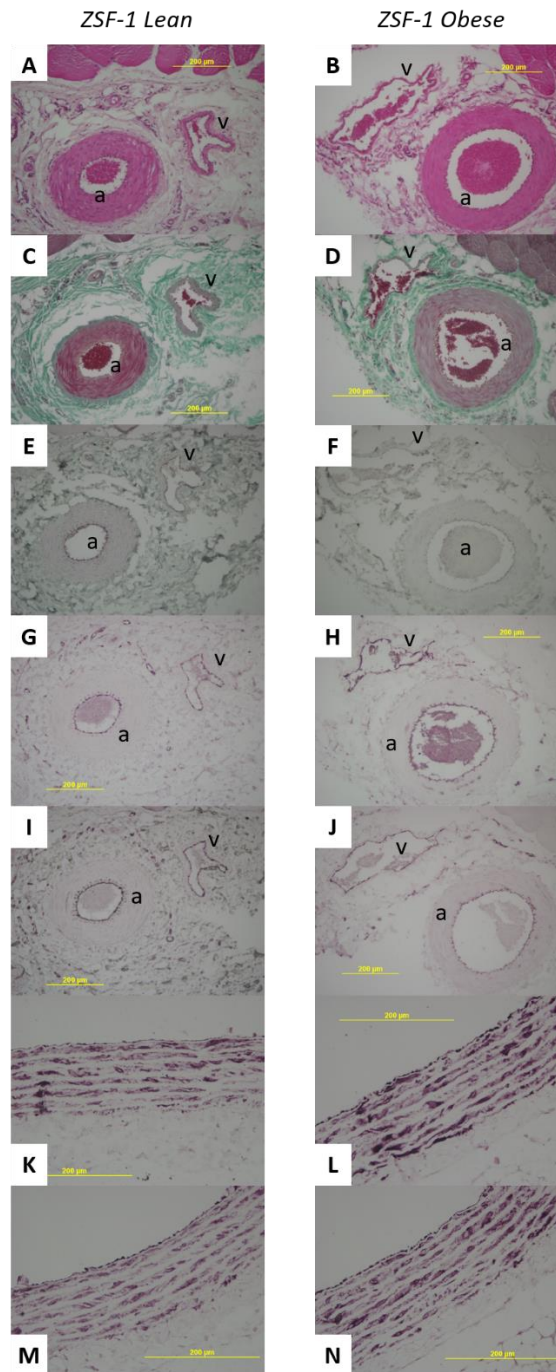


Figure 5: Representative photographs showing femoral artery (a) and femoral vein (v) histology of lean and obese ZSF1 femoral vessels and aorta. Representative immunocytochemistry staining of eNOS (E,F), COX-1 (G,H) and COX-2 (I,J) in femoral artery and vein of lean and obese ZSF1 rats. In addition, COX-1 (K, L) and COX-2 (M, N) were also shown in thoracic aorta for comparison. Global vascular architecture was appreciate using hematoxylin-erythrosin coloration (A, B,). Green Gomori trichrome (C,D) staining were also performed to highlight muscular cells contrast of vascular media and collagen. Similar observations were made for five additional rats in each group. Tissues were fixed in paraffin before sections of 5µm thickness preceding immunochemistry experiments. Similar observations were observed in four additional rats per group.

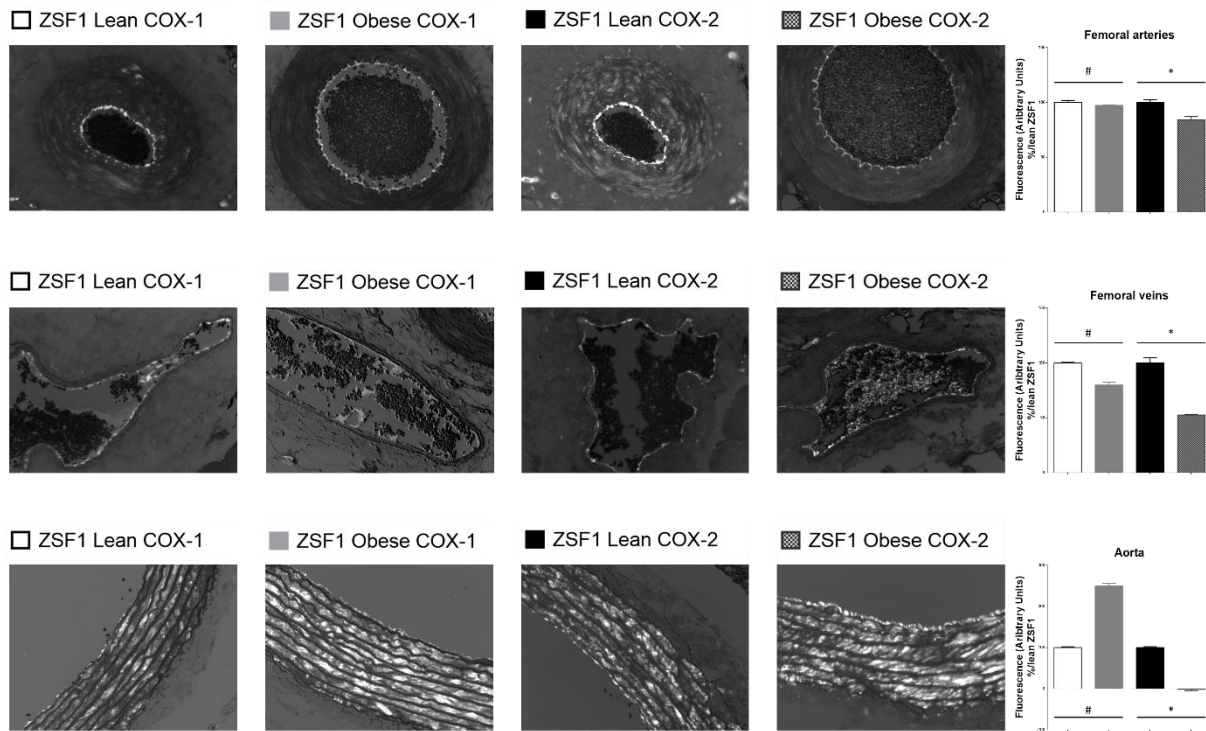


Figure 6: Representative immunofluorescence photographs of COX-1 and COX-2 in lean and obese ZSF1 rats in aorta and femoral artery and vein. Tissues were fixed in paraffin before sections of 5 μ m thickness. COX-1 and COX-2 semi-quantification was determined using the expression of COX-1 and COX-2 by immunofluorescence analyzed by epifluorescence microscope. Results were expressed as means \pm s.e.m. of four to five rats per group. Lean ZSF1 rats were considered as comparator. $p < 0.05$ were considered to be statistically significant (#*).

Résultats et conclusion

Ce travail nous a permis de montrer que le cumul des FRCV développés chez le rat obèse ZSF1 jeune induisait une dysfonction endothéliale sévère dans l'artère et la veine fémorale. Nous avons ainsi pu mettre en évidence dans l'artère fémorale une dysfonction endothéliale relevant d'une double composante, à la fois COX-dépendante et COX-indépendante, comme ce que nous avons pu observer chez le rat âgé dans la précédente étude. Dans la veine fémorale, la dysfonction endothéliale était exclusivement liée à un mécanisme COX-dépendant avec une importante génération de facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium. En essayant d'identifier plus précisément le rôle des COX, nous avons pu montrer que la COX-1 et la COX-2 n'étaient pas à l'origine des mêmes prostanoïdes, protecteurs ou délétères, entre l'artère et la veine fémorale. En effet, contrairement à COX-2 qui n'était pas impliquée dans la dysfonction endothéliale chez le rat ZSF1 lean (contrôle), COX-1 était quasi exclusivement responsable de l'altération de la fonction endothéliale dans l'artère fémorale. Sous le poids des FRCV, COX-1 perdait son profil délétère et COX-2 devenait protectrice alors que de manière parallèle, leur expression était significativement diminuée dans la paroi vasculaire, en particulier dans l'endothélium. Dans la veine fémorale, au contraire, COX-2 était impliquée de manière exclusive dans la dysfonction endothéliale chez le rat ZSF1 contrôle. Chez le rat obèse, une dysfonction endothéliale sévère a été observée, impliquant à la fois COX-1 et COX-2 avec importante génération d'EDCF, ne pouvant être contrebalancée que par l'inhibition des deux COX à la fois, par l'utilisation d'indométhacine. En sus de cette modification du profil des métabolites issus de la dégradation de l'acide arachidonique, l'expression de COX-1 et de COX-2 diminuait dans la veine fémorale.

En conclusion, la pression exercée par les FRCV d'athérosclérose chez le rat ZSF1 jeune porteur d'un syndrome métabolique est à l'origine d'une dysfonction endothéliale artérielle et veineuse. Les cyclooxygénases sont à l'origine de la dysfonction endothéliale veineuse. Si l'implication de COX-1 et de COX-2 diffère entre l'artère et la veine fémorale, les FRCV influencent le métabolisme de l'acide arachidonique vers des métabolites plus délétères dans la veine fémorale, malgré une diminution de l'expression des COX au niveau endothélial. Ces constatations peuvent en partie fournir une explication pour le surrisque de thrombose veineuse non provoquée associée au cumul des FRCV dans les études épidémiologiques humaines.

Quatrième étude : effets d'une formulation optimisée d'Oméga-3, l'EPA:DHA 6:1, sur la prévention de la dysfonction endothéliale vasculaire périphérique fémorale liée à l'âge et le risque de thrombose veineuse chez le rat Wistar

Introduction

La prise en charge de la maladie veineuse thrombo-embolique (MVTE) repose sur l'identification des facteurs de risque de thrombose veineuse pour l'adaptation thérapeutique et le choix de la durée du traitement anticoagulant pour un patient donné. Malgré les connaissances actuelles sur la MVTE, 30 à 50% des événements demeurent idiopathiques, sans facteur de risque identifiable. Nos travaux précédents ont montré que dans cette catégorie de patients qui présentent une MVTE non provoquée, le cumul des facteurs de risque cardiovasculaires d'athérosclérose (FRCV) est associé de manière significative à un surrisque de thrombose veineuse non provoquée, à la gravité de l'évènement et au risque de récurrence. Parmi ces FRCV, l'âge, qui est aussi un des principaux facteurs de risque de MVTE, est associé à une augmentation du risque hémorragique lors du traitement anticoagulant instauré pour la prévention de la récurrence de thrombose veineuse. De nouvelles voies de traitements ou de nouvelles molécules doivent être envisagées pour réduire le risque hémorragique et préserver le bénéfice antithrombotique. Puisque les FRCV et l'âge induisent une dysfonction endothéliale avec l'acquisition d'un profil pro-thrombotique COX-dépendant, notamment au niveau de la veine fémorale d'après nos travaux précédents, peut-être qu'une piste

thérapeutique, alternative ou complémentaire au traitement anticoagulant, pourrait reposer sur la modulation du métabolisme de l'acide arachidonique.

En effet, nous avons montré que sous le poids des FRCV et de l'âge, le métabolisme de l'acide arachidonique est dévié vers des prostanoides plus délétères et au potentiel pro-thrombogène via une possible activation plaquettaire. Il a été montré que les oméga-3 pouvaient interférer avec le métabolisme de l'acide arachidonique pour la génération de prostanoides de série 3, plus vasodilatateurs, moins vasoconstricteurs et moins activateurs plaquettaires. Dans ce travail, nous testons l'hypothèse qu'une formulation standard d'oméga-3 (EPA:DHA 1:1) ou une formulation optimisée (EPA:DHA 6:1) peuvent prévenir la dysfonction endothéliale liée à l'âge au niveau des artères et des veines fémorales chez le rat Wistar vieillissant avec une diminution du rôle délétère des COX, permettant de diminuer le risque thrombotique, en particulier veineux.

EPA:DHA 6:1 prevents age-related endothelial dysfunction in rat femoral vessels: role of cyclooxygenases and potential risk for venous thrombosis

S. Gaertner ^(1,2), C. Auger ⁽¹⁾, M. A. Farooq ⁽¹⁾, B. Pollet ⁽¹⁾, S. Khemais-Benkhiat ⁽¹⁾, S. Schrevens ⁽¹⁾, S. Park ⁽¹⁾, F. Toti ⁽¹⁾, D. Stephan ⁽²⁾, V. B. Schini-Kerth ⁽¹⁾.

(5) UMR CNRS 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France;

(6) Service d'Hypertension et Maladies Vasculaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

Corresponding author: Sébastien GAERTNER, Hypertension et maladies vasculaires, CHRU, 1 place de l'hôpital 67091 BP 426 Strasbourg, France

Email: sebastien.gaertner@chru-strasbourg.fr

Keywords: Venous thrombosis, endothelial dysfunction, cyclooxygenase, omega-3 polyunsaturated fatty acids

Abstract

Aging is associated with an increased risk of venous thromboembolism (VTE) and an increased risk of bleeding during the anticoagulation therapy necessary to prevent VTE recurrence, a major issue especially in elderly patients. The eicosapentaenoic acid:docosahexaenoic acid (EPA:DHA) 6:1 omega-3 polyunsaturated fatty acids formulation has been shown to induce vascular protection by improving endothelial function. This study examined whether oral intake of EPA:DHA 6:1 prevents the age-related femoral venous and arterial endothelial dysfunction and the prothrombotic prostanoids-related profile in middle-aged rats. Seven to eight months-old male Wistar rats received orally either nothing, corn oil, EPA:DHA 6:1 or EPA:DHA 1:1 (500mg kg⁻¹ per day) for seven days before sacrifice. Femoral artery and vein rings reactivity was performed using a wire myograph. Endothelium-dependent relaxation pathways, endothelium-dependent hyperpolarization and nitric oxide-mediated relaxation, were not modified by oral intake of EPA:DHA. EPA:DHA 6:1 prevented endothelium-derived constrictive factors (EDCF) generation in femoral artery and improved endothelial relaxation to acetylcholine in femoral vein by modulating the cyclooxygenase (COX) pathway. The age-related endothelial dysfunction was improved by COX-1 inhibitor in femoral artery and by COX-2 inhibitor in femoral vein. These data show that EPA:DHA 6:1 reduced the age-related endothelial dysfunction with reduced EDCF responses and improved relaxations, COX-2 deleterious effects in both femoral artery and vein, and the associated prothrombotic response. Therefore, EPA:DHA 6:1 could be an interesting potential therapy in VTE recurrence prevention.

Introduction

Venous thromboembolism (VTE), encompassing deep vein thrombosis and pulmonary embolism, remains a major cause of cardiovascular mortality (1,2). Annual incidence of VTE increase exponentially with age, whatever the gender or ethnicity. The identification of risk factors for venous thrombosis is still a major issue to prevent VTE and its recurrence, since they guide treatment intensity and duration (3). However, up to 50% of VTE events remain unprovoked, leading to long-term anticoagulation exposing patients to a hemorrhagic risk (4–7). Despite long-term anticoagulation, almost one-third of patients are exposed to VTE recurrence within 10 years (8). Some studies provide evidences for a less effective VTE prevention in elderly patients whether or not thromboprophylaxis was prescribed, suggesting an age-dependent and anticoagulant-independent risk for VTE (9). As bleeding risk increases also with aging, new therapeutic approaches for prevention of VTE are warranted (10). Aging is associated with deleterious effects on the vascular system, at least in part, by inducing cyclooxygenases (COXs) overexpression, increased endothelium-dependent constricting factors (EDCF) formation, decreased prostacyclin synthesis and increased uncoupling of endothelial nitric oxide synthase (eNOS (11–15)). Therefore, COXs seems to have a pivotal role in age-related endothelial dysfunction, leading in turn to increased vascular events. Physiologically, COXs metabolize arachidonic acid (AA) into vasoactive prostanoids, but other fatty acids, such as omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), including two major compounds, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), can take the place of AA thus leading to the formation of different prostanoids like the vasoprotective three-series prostanoids derived from EPA and DHA (16,17). Previous studies have shown that purified EPA and DHA formulations induce potent and sustained endothelium-dependent

relaxations of arterial rings by stimulating the formation of nitric oxide (NO) and endothelium-derived hyperpolarization (EDH) (18,19). Moreover, the potency of EPA:DHA formulations to induce endothelium-dependent relaxation depend on both purity and ratio of EPA:DHA and that one of the most potent formulation is EPA:DHA 6:1 (18).

Our team's previous work showed that aging induced a venous endothelial dysfunction leading to prothrombotic profile in lower limb femoral vein. Thus, the present study evaluated whether the oral intake of EPA:DHA 6:1 formulation can prevent the age-related femoral vein endothelial dysfunction in middle-aged rats with a reduction of deleterious prostanoids generation by acting on COX pathways.

Methods

Ethics statement

This study conforms to the Guide of Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA; NIH publication number 85-23, revised 1996). In accordance with the European Union laws for animal studies, all procedures were approved by the institutional ethics committee (APAFIS#10073-2017053013335510v2).

Preparation of omega-3 PUFAs products

Highly purified EPA and DHA were provided by Pivotal Therapeutics, Inc (Woodbridge, ON, Canada). EPA:DHA 6:1 (w/w) and EPA:DHA 1:1 ratios were prepared and adjusted to the relative purity of each compound under nitrogen flux to avoid oxidation of the omega-3

PUFAs. Thereafter, the formulation is aliquoted in amber glass vials under nitrogen, and stored at 4°C until use.

Animals and *in vivo* treatment of rats

Forty middle-aged male Wistar Kyoto rats (28 - 32 weeks old) from Janvier labs (Le Genest St Isle, France) were randomly divided into four groups of ten rats each. Rats received daily by gavage 500mg kg⁻¹ per day of either EPA:DHA 6:1, EPA:DHA 1:1 or corn oil (control with gavage) for 7 days. The fourth group did not received gavage (control without gavage).

Vascular reactivity studies

To determine the effect of EPA:DHA 6:1 and EPA:DHA 1:1 treatment on the endothelial function, vascular reactivity studies were performed on femoral using a Halpern-Mulvany myograph (model 620M, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark). Briefly, after vascular excision and careful connective tissue cleaning, calibrated rings cutting (1.8 mm) were suspended between two stainless steel wires with a diameter of 40 µm in an organ chamber filled with oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Krebs bicarbonate solution (mM: NaCl 119, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.18, CaCl₂ 1.25, NaHCO₃ 25, and D-glucose 11, pH 7.4, 37°C) for the determination of changes in isometric tension. The femoral vein rings were stretched to 2 mN of tension whereas femoral artery rings were stretched to 3 mN of tension and then allowed to equilibrate for 90 min. After the equilibration, Krebs bicarbonate solution was removed and the rings were immediately exposed to a Krebs bicarbonate solution containing a high concentration of potassium (80 mM) until reproducible contractile responses were obtained. After a 20 min washout period with return of the rings to a steady state, rings were contracted with serotonin (5-HT, 1 µM) to ~ 70% of the maximal contraction induced by the high

potassium solution before addition of acetylcholine (ACh, 1 μ M) to test the endothelial function. After washout and a 20 min equilibration period, rings were again contracted with 5-HT before the construction of a concentration-relaxation curve to either ACh or sodium nitroprusside (SNP, a NO donor). In some experiments, rings were exposed to a pharmacological agent for 20 min before contraction with 5-HT. To study the role of cyclooxygenase (COX)-derived vasoactive prostanoids, rings were incubated with indomethacin (10 μ M, a non-selective COX inhibitor). To distinguish the respective role of COX-1 and COX-2, a COX-1 inhibitor (NS398, 3 μ M) or a COX-2 inhibitor (SC560, 0.3 μ M) were used. To study NO-mediated relaxation, rings were incubated in the presence of indomethacin (10 μ M) and TRAM-34 plus UCL-1684 (10 μ M each, inhibitors of $I_{K_{Ca}}$ and $S_{K_{Ca}}$, respectively) to prevent the formation of vasoactive prostanoids and endothelium-derived hyperpolarization (EDH) - mediated relaxation, respectively. The EDH-mediated relaxation was studied in rings incubated with indomethacin and N^G-nitro-L-arginine (L-NA, an eNOS inhibitor) to prevent the formation of vasoactive prostanoids and NO, respectively. Relaxations were expressed as the percentage of the reversal of the contraction to 5-HT.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using an analysis of variance followed by the Bonferroni *post-hoc* test as appropriate using GraphPad Prism (version 5 for Microsoft windows, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results

EPA:DHA 6:1 improves endothelial relaxation in femoral artery and vein

In middle-aged rat femoral artery rings, an impairment of relaxations in response to ACh was observed with maximal relaxation reaching 51.3% in control group (Figure 1). This impairment was also found in other groups with a maximal ACh-induced relaxation amounting to 47.4 % in corn oil, 52.3 % in EPA:DHA 1:1 and 55.7 % in EPA:DHA 6:1 groups. The ACh-induced relaxation was associated with contractions in response to highest concentrations of ACh starting from 3 μ M. This contractile response was significantly reduced in the EPA:DHA 6:1 group compared to control or corn oil (Figure 1).

In middle-aged femoral vein rings, ACh caused concentration-dependent relaxations with a maximum relaxation at 10 μ M (Figure 1). The ACh-induced relaxation was associated with contractions in response to highest concentrations of ACh starting from 3 μ M only in the corn oil group. In femoral veins, relaxation was significantly improved in groups taking EPA:DHA 1:1 and 6:1 compared to control group.

Characterization of endothelial dysfunction in femoral artery and vein

The contractile responses to high concentration of ACh observed in femoral artery rings were significantly abolished in the presence of the cyclooxygenase inhibitor indomethacin with a significant improvement of maximal relaxations in artery rings reaching around 72.7%, 68.3%, 73.6% and 74.6% in control, corn oil, omega 1:1 and omega 6:1 groups, respectively (Figure 2). The addition of TRAM 34 and UCL-1684, two inhibitors of EDH, to indomethacin had no additional effect on the relaxation to ACh. A strong inhibitory effect was observed in presence of indomethacin and L-NA, an eNOS inhibitor, indicating a major role of NO (Figure 2). In the

femoral vein, ACh-induced relaxations were significantly improved by indomethacin only in the corn oil group. The addition of TRAM-34 and UCL-1684 to indomethacin significantly reduced relaxation only in EPA:DHA 1:1 and EPA:DHA 6:1 groups (Figure 2). In contrast, addition of L-NA plus indomethacin caused a significant inhibition of the ACh-induced relaxation in all groups, indicating a predominant role of NO (Figure 2).

The ACh-induced relaxation was improved by selective COX-1 inhibition in femoral artery and mostly by COX-2 inhibition in femoral vein of middle-aged rats

In all groups, femoral artery rings showed similar improvements of endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine in presence of either indomethacin or SC560, a selective COX-1 inhibitor (Figure 3). Selective COX-2 inhibition using NS398 further increased the contractile responses to high concentrations of ACh in all control except EPA:DHA 6:1 group (Figure 3).

In femoral vein rings from the control group, COX-2 inhibition improved significantly endothelium-dependent relaxation in response to ACh. COX-1 inhibition significantly improved relaxation in control and corn oil groups by abolishing contractile responses to high ACh concentrations, whereas it did not affect relaxation in both EPA:DHA groups (Figure 3).

EPA:DHA 1:1 and 6:1 prevented COX-2-related EDCF formation in femoral artery rings and EPA:DHA 6:1 impaired relaxation in response to acetylcholine in case of COX-2 inhibition in femoral vein

In presence of selective COX-1 inhibitor, ACh-induced relaxations were not different between all groups. Similarly, selective COX-2 inhibition in the presence of NS398 in femoral artery rings did not improved the maximal relaxation in response to ACh but was associated with reduced

contractile responses to high concentration of ACh in EPA:DHA 1:1 and EPA:DHA 6:1 groups (Figure 4). In femoral vein, COX-2 inhibition significantly altered ACh-induced relaxation in EPA:DHA 6:1 group whereas no difference has been observed in EPA:DHA 1:1 or corn oil compared to control group.

Sodium nitroprusside-induced relaxation in femoral artery and vein of middle-aged rats

In the presence of indomethacin, TRAM-34 and UCL-1684, and L-NA, sodium nitroprusside (a NO donor) induced similar concentration-dependent relaxations in the femoral artery within the four groups of rats (Figure 5). In femoral vein rings, Sodium nitroprusside-induced relaxation was non-different between control, corn oil, omega 1:1 or omega 6:1 groups.

Discussion

In the present study, we show that age-related endothelial dysfunction in femoral artery and veins is characterized by a reduced maximal relaxation in response to acetylcholine associated with increased contractile responses at higher concentrations of acetylcholine. The fact that these contractions are indomethacin-sensitive indicate that they are due to the increased formation of EDCF both in artery and veins, and the use of selective COX inhibitors suggest that EDCF formation is mainly COX-1-mediated in the femoral artery and mediated by both COX-1 and COX-2 in the femoral vein of middle-aged rats. Moreover, our work indicates that short term oral intake of an optimized omega-3 EPA:DHA 6:1 formulation partially but significantly prevents the age-related endothelial dysfunction in femoral vessels. The characterization of the underlying mechanisms indicates that EPA:DHA 6:1 is able to decrease

COX-dependent generation of EDCF in femoral vessels and to improve endothelium-dependent vasorelaxation of femoral vein in response to acetylcholine. We were able to demonstrate that EPA:DHA 6:1 affected the metabolism of arachidonic acid *via* COX-1 pathway by EDCF formation in femoral artery. Conversely, EPA:DHA 1:1 and 6:1 were able to abolish the COX-2-mediated formation of EDCF in femoral veins. These results therefore suggest that EPA:DHA 6:1 confers not only arterial but also venous vascular protection during aging, at least in part, by modulating COX-mediated formation of vasoconstricting prostanoids. Moreover, we have shown that the source of EDCF was different between femoral artery and vein, involving COX-1 in artery but COX-2 in vein.

A previously published study has shown that EPA:DHA 6:1 prevents endothelial function and enhances vascular protection in a rat model of hypertension induced by angiotensin II both by reducing EDCF formation and by improving EDH- and NO-mediated relaxations in the second branch of the mesenteric artery (20). EPA:DHA 6:1 treatment increases the plasma levels of omega-3 PUFAs compared to omega-6 PUFAs with a reduction of nearly 65% in the omega-6/omega-3 ratio (20). The reduction of the omega-6/omega-3 ratio has shown its beneficial effects by improving the activation of eNOS and reducing the markers of oxidative stress and inflammation (18,21,22). These effects have been attributed in part to the ability of EPA to compete with arachidonic acid for its metabolization by COX, leading to the increased formation of 3-series prostanoids that have anti-inflammatory properties (PGE₃), are more potent vasodilators (PGI₃) and less pro-aggregating (TXA₃) than arachidonic acid-derived 2-series (23). Moreover, the reduction of the omega-6/omega-3 ratio has also been shown to promote the production of omega-3-derived anti-inflammatory metabolites such as resolvins

and protectins (24–26). Resolvin D1 prevents the hyperreactivity induced by endothelin-1 and proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 in human pulmonary artery (27).

Moreover, COX-2 mediates the formation of electrophilic fatty acid oxo-derivatives (EFOX) from the omega-3 fatty acids docosahexaenoic, docosapentaenoic and docosatetraenoic acid (28). COX-2 inhibition by NS398 completely inhibits the generation of EFOXs while the inhibition of COX-1 by aspirin increases the production of EFOX derivatives, highlighting their COX-2-dependent origin. The 17-EFOX-D6 and 17-EFOX-D5 derivatives are PPAR γ receptor agonists activating the Nrf2-dependent antioxidant responses and reducing inflammatory responses (28,29). Therefore, the omega 3 could improve the endothelial function and vascular protection both by reducing the formation of deleterious 2-series prostanoids and by increasing the formation of COX-mediated omega3-derived metabolites with anti-inflammatory properties.

In human clinical trials, supplementation with omega-3 has been shown to reduce the risk of cardiovascular death, particularly in patients with higher cardiovascular risk (30–32). Some studies contradict this observation, notably a meta-analysis of the Cochrane database, but it is important to underline that the studies evaluating impact of omega-3 on the cardiovascular system are very heterogeneous with different pathologies, with very different treatment durations, and with various dose and a non-equivalent quality of omega-3 intake (33,34).

Beneficial effect of omega-3 on the peripheral vein has already been observed in *ex vivo* studies using human saphenous vein, where 18 hours of vessels pretreatment by EPA and DHA (100 μ M each) reduced their contraction induced by norepinephrine in normal veins (35). In varicose vein associated with inflammatory conditions, pretreatment with EPA and DHA also

reduced the generation of MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) and TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha). Previous clinical studies based on data from a prospective VTE registry in patients aged 65 and older showed that whole-blood omega-3 fatty acid level predicted venous thromboembolism recurrence or total mortality in elderly patients with acute venous thromboembolism (36,37). Indeed, omega-3 level was inversely correlated with the cumulative incidence of recurrent VTE or total mortality. In patients with higher circulating levels of omega-3 acids, the risk reduction for recurrent VTE was more than 60% within 6-months follow-up without increased hemorrhagic risk. However, in the study by Reiner et al., the same group showed that oral intake of an omega-3 alpha-linolenic acid-rich treatment did not prevent venous thrombosis in two mice models of thrombosis induced by inferior vena cava stenosis or endothelial lesion generated in the jugular vein (38). The lack of effect of omega-3 treatment in this study could be due to the models used as they are venous thrombosis caused by irreversible lesions, where the endothelial formation of anti-thrombotic compounds may be insufficient to prevent thrombosis. This situation is different from the unprovoked venous thrombosis observed in human pathology where no extensive endothelial lesion could be observed. Indeed, our results suggest that omega-3 could prevent venous thrombosis, at least in part, by decreasing the venous endothelial formation of pro-thrombogenic prostanoids and/or by increasing the endothelial formation of vasoprotective COX-derived metabolites.

In conclusion, aging is associated with the development of an arterial but also a venous endothelial dysfunction in the femoral vessels, characterized by a reduced endothelium-dependent relaxation and an increased EDCF formation in middle aged rats. Short term treatment with an optimized formulation of omega-3, EPA:DHA 6:1, was able to reduce COX-

2 mediated EDCF formation and to improve relaxation in femoral vein. Taken together, these data, consistent with literature, suggest that EPA:DHA 6:1 could be an interesting new therapeutical approach for the prevention of VTE and its recurrence.

Acknowledgments and funding

We are grateful to the Vascular Medicine French Society (Société Française de Médecine Vasculaire - SFMV) that helped fund this study by awarding research grants.

References

1. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost JTH.* avr 2007;5(4):692-9.
2. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation.* 17 juin 2003;107(23 Suppl 1):I4-8.
3. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med.* 27 mars 2000;160(6):809-15.
4. Kearon C, Ageno W, Cannegieter SC, Cosmi B, Geersing G-J, Kyrle PA, et al. Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: guidance from the SSC of ISTH. *J Thromb Haemost JTH.* juill 2016;14(7):1480-3.
5. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, Blaivas A, Jimenez D, Bounameaux H, et al. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest.* févr 2016;149(2):315-52.
6. Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. *Lancet Lond Engl.* 16 août 2003;362(9383):523-6.
7. Kyrle PA, Rosendaal FR, Eichinger S. Risk assessment for recurrent venous thrombosis. *Lancet Lond Engl.* 11 déc 2010;376(9757):2032-9.
8. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 27 janv 2015;131(4):e29-322.
9. Hemon F, Fouchard F, Tromeur C, Lacut K, Le Gal G, Mottier D, et al. Association between hospitalization for acute medical illness and VTE risk: A lower efficacy of thromboprophylaxis in elderly patients? Results from the EDITH case-control study. *Eur J Intern Med.* oct 2017;44:39-43.
10. Tritschler T, Aujesky D. Venous thromboembolism in the elderly: A narrative review. *Thromb Res.* juill 2017;155:140-7.
11. Matz RL, de Sotomayor MA, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br J Pharmacol.* sept 2000;131(2):303-11.
12. Tang EHC, Vanhoutte PM. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics.* 19 févr 2008;32(3):409-18.

13. Tokunaga O, Yamada T, Fan JL, Watanabe T. Age-related decline in prostacyclin synthesis by human aortic endothelial cells. Qualitative and quantitative analysis. *Am J Pathol.* avr 1991;138(4):941-9.
14. Nakajima M, Hashimoto M, Wang F, Yamanaga K, Nakamura N, Uchida T, et al. Aging decreases the production of PGI₂ in rat aortic endothelial cells. *Exp Gerontol.* déc 1997;32(6):685-93.
15. Yang Y-M, Huang A, Kaley G, Sun D. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* nov 2009;297(5):H1829-1836.
16. Mori TA. Marine OMEGA-3 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. *Fitoterapia.* 27 sept 2017;
17. Grimminger F, Mayer K, Krämer HJ, Stevens J, Walmrath D, Seeger W. Differential vasoconstrictor potencies of free fatty acids in the lung vasculature: 2-versus 3-series prostanoid generation. *J Pharmacol Exp Ther.* oct 1993;267(1):259-65.
18. Zgheel F, Alhosin M, Rashid S, Burbhan M, Auger C, Schini-Kerth VB. Redox-sensitive induction of Src/PI3-kinase/Akt and MAPKs pathways activate eNOS in response to EPA:DHA 6:1. *PLoS One.* 2014;9(8):e105102.
19. Omura M, Kobayashi S, Mizukami Y, Mogami K, Todoroki-Ikeda N, Miyake T, et al. Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca²⁺-independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. *FEBS Lett.* 5 janv 2001;487(3):361-6.
20. Niazi ZR, Silva GC, Ribeiro TP, León-González AJ, Kassem M, Mirajkar A, et al. EPA:DHA 6:1 prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase- and COX-derived oxidative stress. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens.* 7 sept 2017;
21. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* oct 2002;56(8):365-79.
22. Dasilva G, Pazos M, García-Egido E, Gallardo JM, Rodríguez I, Cela R, et al. Healthy effect of different proportions of marine ω -3 PUFAs EPA and DHA supplementation in Wistar rats: Lipidomic biomarkers of oxidative stress and inflammation. *J Nutr Biochem.* nov 2015;26(11):1385-92.
23. Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ.* déc 2015;24(6):931-41.
24. Seki H, Tani Y, Arita M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* sept 2009;89(3-4):126-30.
25. Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac R-L, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem.* 25 avr 2003;278(17):14677-87.

26. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients*. mars 2010;2(3):355-74.
27. Hiram R, Rizcallah E, Sirois C, Sirois M, Morin C, Fortin S, et al. Resolvin D1 reverses reactivity and Ca²⁺ sensitivity induced by ET-1, TNF- α , and IL-6 in the human pulmonary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 déc 2014;307(11):H1547-1558.
28. Groeger AL, Cipollina C, Cole MP, Woodcock SR, Bonacci G, Rudolph TK, et al. Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nat Chem Biol*. juin 2010;6(6):433-41.
29. Malur A, McCoy AJ, Arce S, Barna BP, Kavuru MS, Malur AG, et al. Deletion of PPAR gamma in alveolar macrophages is associated with a Th-1 pulmonary inflammatory response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 mai 2009;182(9):5816-22.
30. Maki KC, Palacios OM, Bell M, Toth PP. Use of supplemental long-chain omega-3 fatty acids and risk for cardiac death: An updated meta-analysis and review of research gaps. *J Clin Lipidol*. oct 2017;11(5):1152-1160.e2.
31. Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol*. 11 août 2009;54(7):585-94.
32. Alexander DD, Miller PE, Van Elswyk ME, Kuratko CN, Bylsma LC. A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials and Prospective Cohort Studies of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Long-Chain Omega-3 Fatty Acids and Coronary Heart Disease Risk. *Mayo Clin Proc*. janv 2017;92(1):15-29.
33. Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, Summerbell CD, Moore H, Worthington HV, et al. Omega 3 fatty acids for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 18 oct 2004;(4):CD003177.
34. Campbell A, Price J, Hiatt WR. Omega-3 fatty acids for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev*. 4 juill 2013;(7):CD003833.
35. Daci A, Özen G, Uyar İ, Civelek E, Yildirim FİA, Durman DK, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce vascular tone and inflammation in human saphenous vein. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 28 août 2017;
36. Méan M, Righini M, Jaeger K, Beer H-J, Frauchiger B, Osterwalder J, et al. The Swiss cohort of elderly patients with venous thromboembolism (SWITCO65+): rationale and methodology. *J Thromb Thrombolysis*. nov 2013;36(4):475-83.
37. Reiner MF, Stivala S, Limacher A, Bonetti NR, Méan M, Egloff M, et al. Omega-3 fatty acids predict recurrent venous thromboembolism or total mortality in elderly patients with acute venous thromboembolism. *J Thromb Haemost JTH*. janv 2017;15(1):47-56.
38. Reiner MF, Martinod K, Stivala S, Savarese G, Camici GG, Lüscher TF, et al. Dietary omega-3 alpha-linolenic acid does not prevent venous thrombosis in mice. *Thromb Haemost*. janv 2015;113(1):177-84.

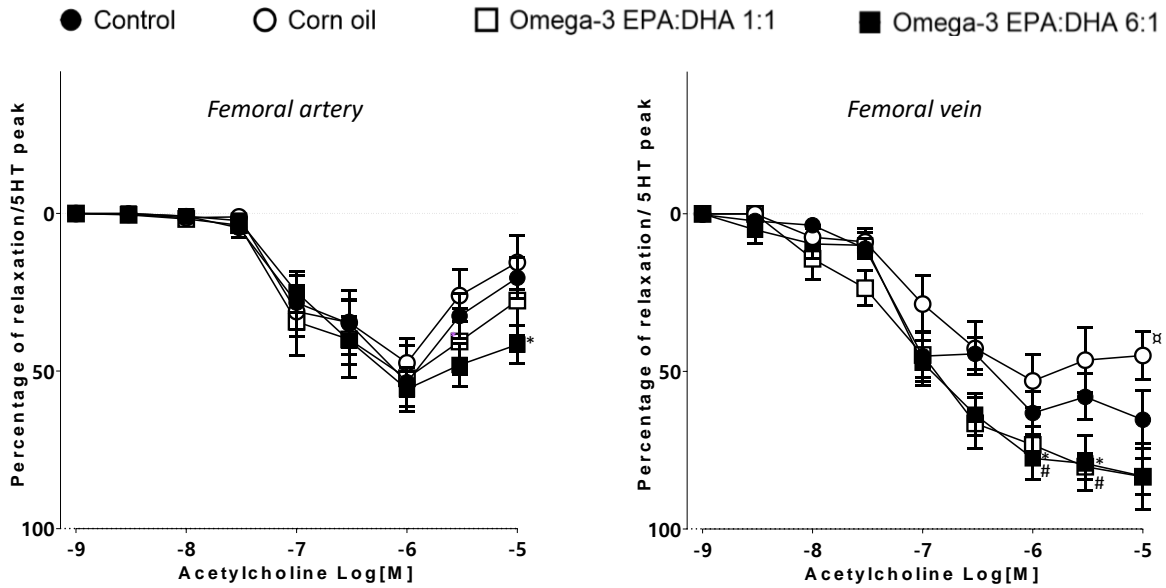


Figure 1: EPA:DHA 6:1 oral intake improve the endothelial function in femoral artery and vein of middle-aged rats. Femoral artery and vein rings of middle-aged Wistar rats were suspended in an organ chamber containing Krebs bicarbonate solution. Rings were precontracted with serotonin ($1 \mu\text{M}$) before the construction of a concentration-relaxation curve to ACh. Results are expressed as percentage of relaxation and given as means \pm s.e.m. of ten rats per group. α $p < 0.05$ for Corn oil vs. control, # $p < 0.05$ for EPA:DHA 1:1 vs. control, and * $p < 0.05$ for EPA:DHA 6:1 vs. control.

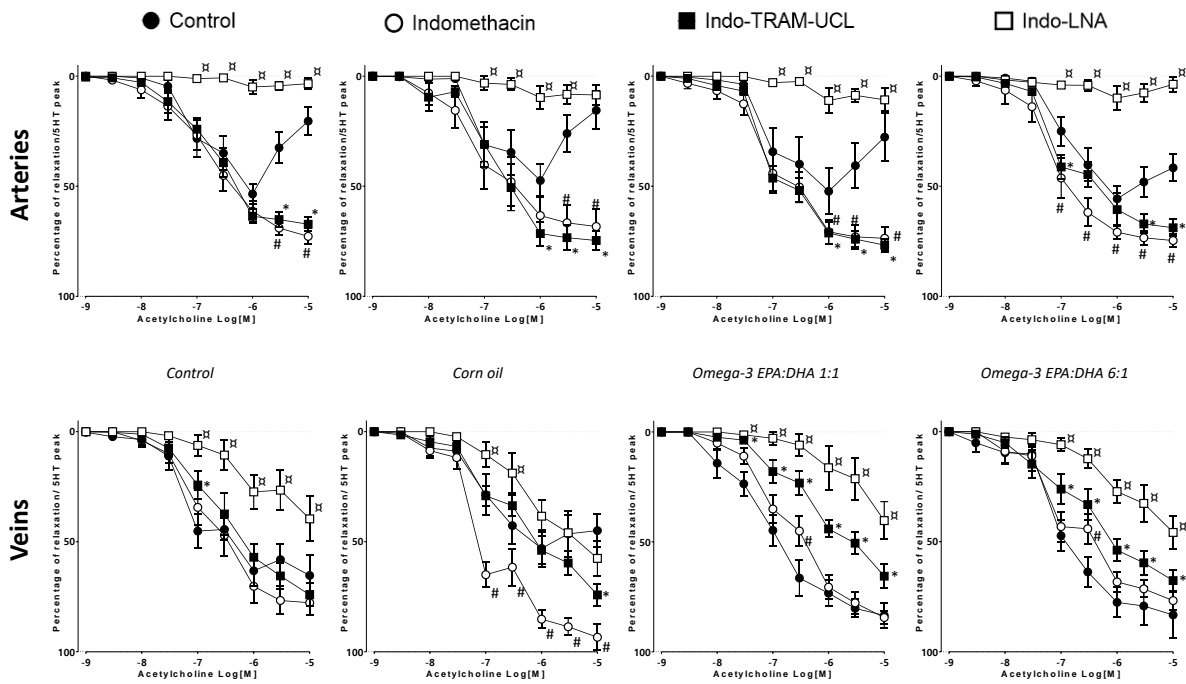


Figure 2: Endothelial function in middle-aged Wistar rat femoral artery and vein rings without pretreatment (control) or with previous seven days corn oil, EPA:DHA 1:1 or EPA:DHA 6:1 oral intake. Femoral artery and vein rings of middle-aged Wistar rats were suspended in an organ chamber containing Krebs bicarbonate solution. Rings were precontracted with serotonin (1 μ M) before the construction of a concentration-relaxation curve to ACh. Some rings were incubated for 20 minutes with either indomethacin (Indo, 10 μ M, inhibitor of cyclooxygenases), TRAM-34 plus UCL-1684 (TRAM-UCL, 10 μ M each, inhibitors of EDH-mediated relaxation) or L-NA (LNA, 300 μ M, inhibitor of NO-mediated relaxation). Results are expressed as percentage of relaxation and given as means \pm s.e.m. of ten rats per group. \times $p < 0.05$ for Indomethacin vs. control, # $p < 0.05$ for Indo-Tram-UCL vs. control, and * $p < 0.05$ for Indo-L-NA vs. control.

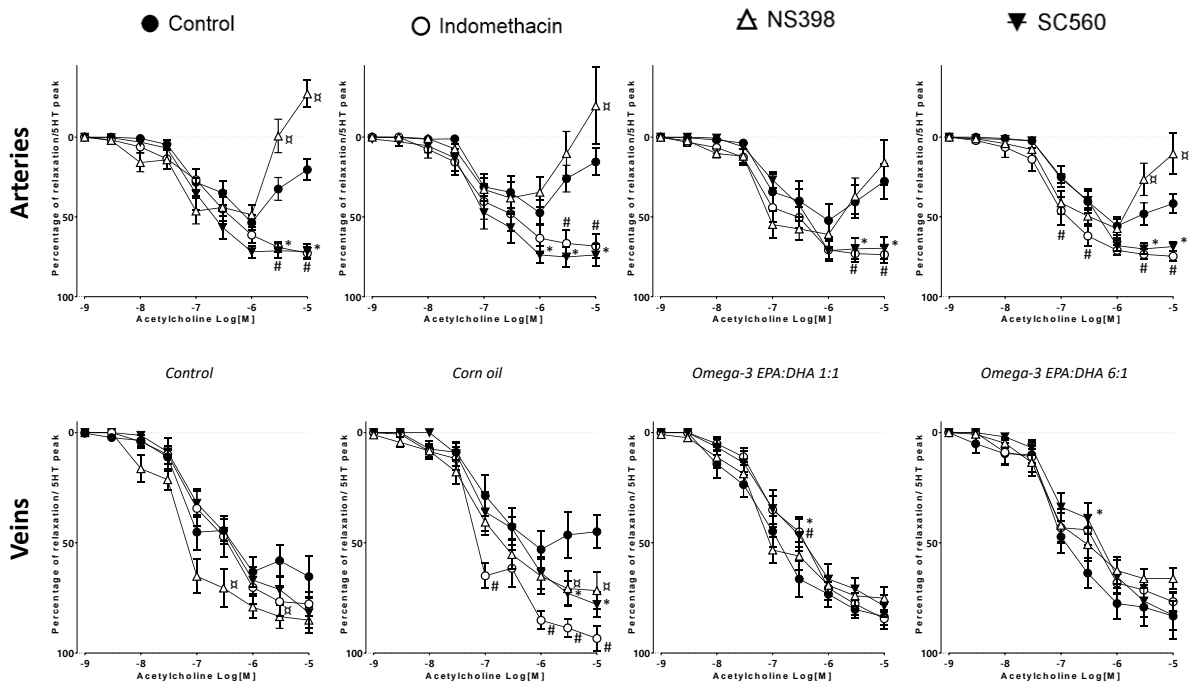


Figure 3: Role COX-1 and COX-2 in the endothelial dysfunction of middle-aged rat femoral artery and vein rings without pretreatment (control) or with previous seven days corn oil, EPA:DHA 1:1 or EPA:DHA 6:1 oral intake. Femoral artery and vein rings of middle-aged Wistar rats were suspended in an organ chamber containing Krebs bicarbonate solution (control). Rings were precontracted with serotonin ($1 \mu\text{M}$) before the construction of a concentration-relaxation curve to ACh. Some rings were incubated for 20 minutes with either indomethacin (Indo, $10 \mu\text{M}$, non-selective inhibitor of cyclooxygenases), SC-560 ($0.3 \mu\text{M}$, selective inhibitor of COX-1) or NS398 ($3 \mu\text{M}$, selective inhibitor of COX-2). Results are expressed as percentage of relaxation and given as means \pm s.e.m. of ten rats per group. # $p < 0.05$ for Indomethacin vs. control, x $p < 0.05$ for NS398 vs. control, and * $p < 0.05$ for SC-560 vs. control.

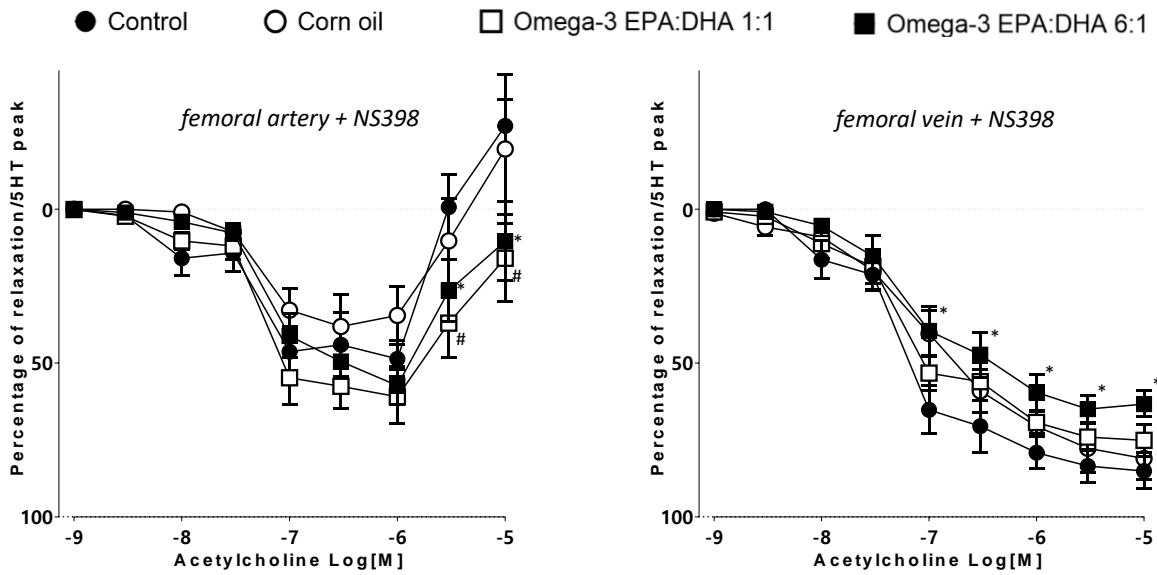


Figure 4: Direct comparison of acetylcholine-induced relaxation in presence of a selective COX-2 inhibitor (NS398) in middle-aged rat femoral artery and vein without pretreatment (control) or with previous seven days corn oil, EPA:DHA 1:1 or EPA:DHA 6:1 oral intake. Femoral artery and vein rings of middle-aged Wistar rats were suspended in an organ chamber containing Krebs bicarbonate solution (control). Rings were precontracted with serotonin (1 μ M) before the construction of a concentration-relaxation curve to ACh in the presence of NS398 (3 μ M, selective inhibitor of COX-2). Results are expressed as percentage of relaxation and given as means \pm s.e.m. of ten rats per group. # p <0.05 for EPA:DHA 1:1 vs. control, * p <0.05 for EPA:DHA 6:1 vs. control.

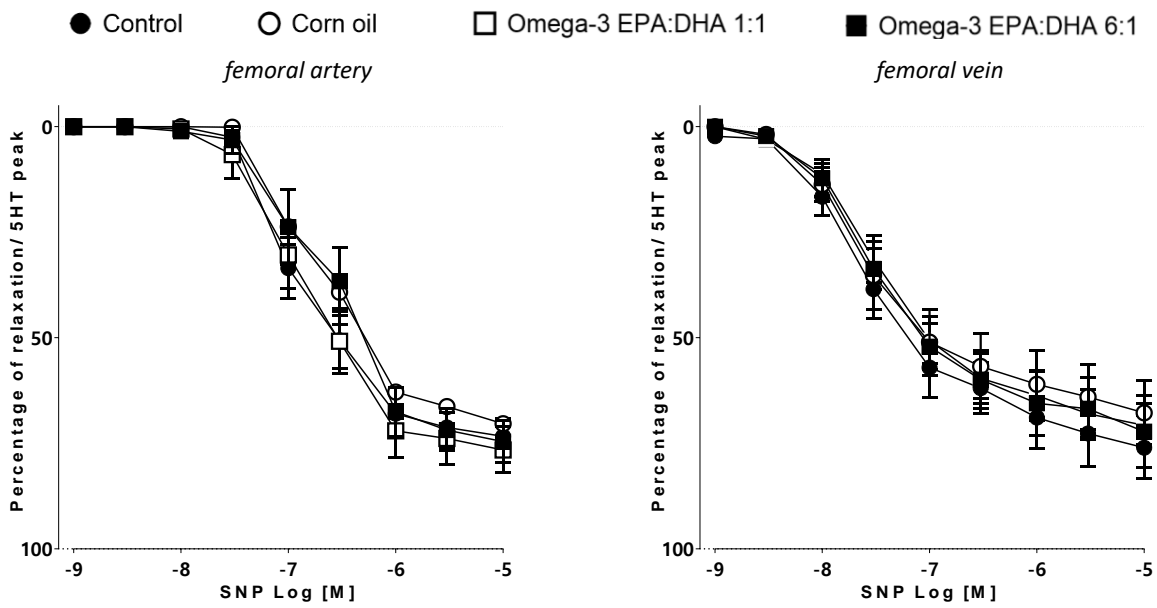


Figure 5: Treatment with either corn oil or omega-3 formulations do not affect vascular smooth muscle function in femoral artery and vein. Femoral artery and vein rings of middle-aged Wistar rats were suspended in an organ chamber containing Krebs bicarbonate solution (control). Rings were precontracted with serotonin (1 μ M) before the construction of a concentration-relaxation curve to sodium nitroprusside, a NO-donor. Results are expressed as percentage of relaxation and given as means \pm s.e.m. of ten rats per group.

Résultats et conclusion

Ce travail a permis de montrer qu'une formulation optimisée d'oméga-3 (EPA:DHA 6:1) permettait de partiellement prévenir la dysfonction endothéliale liée au vieillissement dans les vaisseaux fémoraux chez le rat moyennement âgé Wistar après 7 jours de traitement oral. L'EPA:DHA 6:1 permettait la diminution de la production de facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium *via* les cyclo-oxygénases dans l'artère fémorale et d'augmenter la relaxation induite par l'acétylcholine dans les veines fémorales. Nous avons pu préciser que l'EPA:DHA 6:1 influençait le métabolisme de l'acide arachidonique en agissant sur la voie de COX-2 en diminuant la production d'EDCF et les effets délétères de son inhibition dans l'artère et en induisant des prostanoïdes vasodilatateurs dans la veine fémorale. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de l'EPA:DHA 6:1 sur la voie de COX-1. Les effets de l'EPA:DHA 6:1 étaient objectivés uniquement au niveau de l'endothélium puisque nous n'avons pas retrouvé de modulation de la relaxation du muscle lisse en réponse à un donneur de NO, le nitroprussiate de sodium.

En conclusion, le vieillissement est associé à une dysfonction endothéliale artérielle et veineuse fémorale liée à la génération de facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium chez des rats Wistar moyennement âgés. Un traitement oral par une formulation optimisée d'oméga-3 (EPA:DHA 6:1) permet de prévenir la génération d'EDCF dans l'artère fémorale et d'améliorer la relaxation de la veine fémorale en modulant le métabolisme de l'acide arachidonique *via* la voie de COX-2, diminuant le profil pro-thrombotique lié à l'âge. Ainsi, l'EPA:DHA 6:1 pourrait constituer une approche pharmacologique potentielle pour la prévention de la thrombose veineuse et de sa récurrence.

Discussion

Les maladies cardiovasculaires (MCV) artérielles et la maladie veineuse thrombo-embolique (MVTE) sont en général considérées comme des entités distinctes, à la fois sur le plan physiopathologique et de leur traitement (130,131). La MVTE est la résultante d'une combinaison de facteurs de risque qui vont mener à la formation d'un thrombus veineux sous certaines conditions (17). Si certains facteurs de risque de MVTE sont connus, 30 à 50% des évènements demeurent inexpliqués et la thrombose est alors qualifiée de non provoquée (132). Cette qualification n'est pas anodine puisqu'elle expose le patient atteint de MVTE non provoquée à un risque accru de récurrence et nécessite une adaptation du traitement de fond en envisageant un traitement anticoagulant à vie et ce, dès le premier épisode (133–135). Il est donc important d'identifier de nouvelles approches pour mieux comprendre la survenue d'une thrombose veineuse, au-delà des facteurs de risque conventionnels de MVTE, non seulement pour mieux cibler les patients à risque de récurrence et mieux adapter la durée du traitement anticoagulant, mais aussi dans l'espoir d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques.

Ce travail s'intéresse tout particulièrement à effacer la frontière persistante entre les MCV artérielles et la MVTE à travers l'étude des facteurs de risque cardio-vasculaires (FRCV) d'athérosclérose et d'évènement artériels athéro-thrombotiques dans le risque de survenue d'une thrombose veineuse non provoquée. L'ensemble de ce travail a montré que les MCV et la MVTE partagent des facteurs de risques communs que sont les FRCV. Après avoir démontré ce lien dans une étude clinique de cohorte, nos travaux pré-cliniques chez le petit animal ont

également montré une partie des mécanismes sous-jacents et quelle piste thérapeutique pouvait être envisagée en sus du traitement conventionnel par anticoagulants.

Le lien clinique entre les facteurs de risque cardiovasculaires majeurs d'athérosclérose et la maladie veineuse thrombo-embolique

Le début de l'histoire

La recherche sur la compréhension des mécanismes ayant mené à la formation d'une thrombose veineuse reste un enjeu majeur de santé publique pour éviter un premier épisode de MVTE ou sa récurrence puisque cette pathologie, fréquente, peut mener au décès ou à des pathologies chroniques invalidantes comme le cœur pulmonaire chronique ou le syndrome post thrombotique aux membres inférieurs (3,5). Ainsi, plusieurs facteurs de risque sont considérés comme provoquant la MVTE : le cancer, la chirurgie (en particulier la chirurgie orthopédique aux membres inférieurs), l'immobilisation, la fracture des membres inférieurs, la paralysie, la grossesse ou le post partum et le traitement hormonal par oestrogènes (contraceptif ou substitutif) (16). Ces facteurs n'expliquent pas à eux seuls la survenue d'une MVTE pour chaque patient.

Prandoni fut un des premiers en 2003 à évoquer l'association directe entre la thrombose veineuse et l'athérosclérose (33). Il est parti du constat que l'athérome carotidien est un marqueur de l'atteinte athéromateuse diffuse et donc un marqueur d'une atteinte athéroscléreuse d'un autre territoire comme les artères des membres inférieurs

(artériopathie oblitérante des membres inférieurs) ou les coronaires (cardiopathie ischémique). Prandoni *et al.* ont donc émis l'hypothèse que ce marqueur de risque vasculaire représenté par l'athérome carotidien pouvait être plus présent chez les patients ayant présenté un épisode de thrombose veineuse par rapport à un groupe témoin n'ayant jamais présenté de MVTE. Les résultats furent convaincants puisque la prévalence plus élevée des plaques athéromateuses carotidiennes était significativement associée au risque de thrombose veineuse non provoquée par rapport à la thrombose veineuse provoquée (47,1% vs 27,4%) ou par rapport à une population témoin (32%). Les auteurs ont bien souligné que s'ils n'avaient pas établi de lien de cause à effet, un lien était suggéré entre les MCV artérielles et la thrombose veineuse. Cette étude fut dès lors suivie par des travaux épidémiologiques ayant cherché à montrer ou non ce lien pouvant exister entre athérosclérose, et donc FRCV, et MVTE.

Le lien épidémiologique entre FRCV et MVTE : le débat

L'étude de Prandoni en 2003 fit écho à deux études épidémiologiques prospectives de cohorte menées par Goldhaber en 1997 et Hansson en 1999 qui montrèrent que les patients victimes d'un épisode de MVTE non provoquée partageaient certains facteurs de risque communs avec les MCV artérielles comme l'obésité et le tabagisme actif ainsi que l'hypertension artérielle chez la femme (31,136). Forts de cette idée, Becattini *et al.* en 2005 ont ainsi développé cette hypothèse en proposant que les FRCV étant associés à la MVTE, la MVTE pourrait alors être un marqueur de risque d'évènement cardiovasculaire ultérieur (137). Ils ont ainsi publié une étude prospective multicentrique de plus de 350 patients ayant montré que les patients avec

un premier épisode d'embolie pulmonaire présentaient un risque élevé de récurrence de thrombose veineuse mais aussi de survenue d'un évènement cardiovasculaire dans les 3 ans suivant l'épisode index. La principale cause de mortalité chez les patients ayant présenté une embolie pulmonaire était un décès lié à une MCV. L'embolie pulmonaire non provoquée était un risque indépendant d'évènement cardiovasculaire ultérieur, même après ajustement à l'âge, *a fortiori* pour les patients ayant stoppé leur traitement anticoagulant. Ainsi, d'un côté les FRCV favoriseraient la survenue d'une MVTE non provoquée et d'un autre côté la survenue d'une MVTE non provoquée serait un marqueur de risque d'évènement artériel. Toute la question se pose alors de la prise en charge de ces patients et de la place du traitement anticoagulant chez les patients porteurs de FRCV ou de l'extension du traitement anticoagulant après une MVTE non provoquée chez les patients porteurs de FRCV. D'autres études étaient donc nécessaires pour mieux cerner le lien FRCV-MVTE.

Agno en 2006 a ainsi proposé une étude cas-contrôle évaluant la présence d'un syndrome métabolique chez 156 patients consécutifs ayant présenté un épisode aigu de thrombose veineuse profonde (TVP) des membres inférieurs par rapport à 107 patients contrôles adressés pour suspicion de thrombose veineuse mais dont le diagnostic a été récusé (30). Les auteurs ont ainsi mis en évidence une prévalence significativement plus importante du syndrome métabolique chez les patients ayant présenté une TVP non provoquée (OR 1,93). En analyse multivariée ajustée à l'âge, au sexe, au tabagisme et à l'indice de masse corporelle, le syndrome métabolique était un marqueur de risque indépendant de TVP non provoquée.

Dans la même période, Agnelli en 2006 a repris les études portant sur le sujet en posant toute la délicatesse de la problématique : « venous thromboembolism and atherosclerosis : common denominators or different diseases ? ». La MVTE et les MCV sont assurément des

entités cliniques bien distinctes mais elles pourraient partager des facteurs de risque communs, l'un n'excluant pas l'autre (138). Si les auteurs ont bien précisé que des données convaincantes argumentaient en faveur d'un lien entre les MCV artérielles et la MVTE, la nature de ce lien restait inconnue même si les FRCV semblent être communs à ces deux entités.

De nombreux travaux ont par la suite argumenté pour l'existence d'un lien entre l'athérosclérose, les FRCV et la MVTE (139–146).

Du fait de ces cumuls d'études portant sur le sujet, Ageno a proposé en 2008 une méta-analyse visant à évaluer le lien entre FRCV et MVTE (36). A partir de 1949 potentielles publications, la méta-analyse en a retenu 21 (après avoir éliminé les études sans groupe contrôle, celles avec des données insuffisantes ou une population hétérogène) pour un total de 63 552 patients. Sur les 21 études retenues, il y avait 1 registre, 4 études de cohorte prospectives et 16 études cas-contrôle. Les résultats de cette méta-analyse ont montré que certains FRCV étaient significativement associés à la MVTE : l'obésité (OR 2.33), l'hypertension artérielle (OR 1.51) et le diabète (OR 1.41). Le tabagisme actif et l'hypercholestérolémie n'ont pas été associés de manière significative. Bien que l'hypothèse du lien FRCV et MVTE semble se conforter, la méta-analyse présente le risque important de combiner des données hétérogènes, surtout en ce qui concerne le caractère provoqué ou non de l'épisode de MVTE. La limite la plus importante de cette méta-analyse est de ne pas avoir fait d'ajustement à de puissants facteurs confondants comme l'âge ou le poids. A nouveau, l'association semble se porter sur les FRCV intégrés dans le syndrome métabolique. Si le risque propre à chaque FRCV d'être en lien avec la MVTE est faible, leur cumul via le syndrome métabolique pourrait alors être à risque plus important. Une revue de la littérature portant justement sur le risque de MVTE secondaire au

syndrome métabolique a été publiée au même moment et a insisté sur ce surrisque avec un OR variant de 1.22 à 2.38 (38).

Une méta-analyse récente de Mi et al. en 2016 a complété la méta-analyse de Ageno de 2008 avec les études publiées dans l'intervalle, incrémentant le nombre patients analysés à 185 124 (32). Cette deuxième méta-analyse corrobore les données de Ageno avec une association significative retrouvée entre les FRCV et la MVTE : l'obésité (OR 2.45), l'hypertension artérielle (OR 1.40), le diabète (OR 1.78), le tabagisme actif (OR 1.34) et une cholestérolémie plus élevée.

L'ensemble de ces études menant aux mêmes conclusions, il ne semble pas y avoir débat, et pourtant...

Si les études précédentes font état d'un surrisque de MVTE pour les FRCV, l'odds ratio associé à chaque FRCV reste faible, généralement compris entre 1.22 et 1.78, sauf pour l'obésité dont l'odds ratio reste supérieur à 2. Ces valeurs étant somme toute significatives, elles n'expliquent pas à elles seules le lien FRCV-MVTE au vu de l'ampleur de ce risque, d'autant que son calcul repose sur des études de faible puissance. Van Der Hagen a publié en 2006 une étude de cohorte prospective de 4108 patients âgés de plus de 65 ans avec un suivi longitudinal moyen de 11.7 ans (147). Devant la discussion naissante à l'époque du lien FRCV-MVTE, il a proposé d'évaluer si un premier épisode de MVTE, provoqué ou non provoqué, était associé à une maladie athéromateuse infraclinique, évaluée de manière non invasive par la mesure de l'épaisseur intima-media ou la mesure de l'index de pression systolique cheville-bras (IPS) au moment de leur inclusion dans l'étude. Durant ce suivi longitudinal, 133 premiers épisodes de MVTE étaient recensés dont 39% non provoqués. L'analyse de ces évènements a montré qu'ils n'étaient pas reliés à l'athérosclérose infra-clinique et avec une relation inverse

entre la présence de plaques d'athérome au niveau carotidien et la survenue future d'une thrombose veineuse. Ces résultats étaient en opposition avec ceux énoncés par Prandoni en 2003 (33). Une autre cohorte prospective de 19 293 patients avec un suivi longitudinal de 8 ans, n'a pas montré de lien entre certains FRCV et le risque de MVTE, notamment pour l'hypertension artérielle, la dyslipidémie ou le tabagisme actif. Une association positive était uniquement retrouvée pour une obésité avec un indice de masse corporelle $> 30\text{kg/m}^2$ et le diabète (145). Cette association disparaissait avec l'augmentation de la durée du suivi longitudinal dans l'étude de Van Der Hagen. Les mêmes constatations ont été faite dans une étude de cohorte plus récente avec un suivi longitudinal sur 15.5 ans et ayant inclus 15 340 patients (35). Là encore, seule l'obésité (avec un indice de masse corporelle $> 35\text{kg/m}^2$) était associée à la survenue d'un premier épisode de MVTE. La limite de l'analyse de Van Der Hagen est qu'il n'y a pas eu d'ajustement au caractère provoqué ou non provoqué de la MVTE, pouvant ainsi induire un biais important dans les résultats. L'étude la plus récente venant semer le doute sur la force de l'association entre FRCV et MVTE provient de Mahmoodi et al. en 2017 (37). Les auteurs ont rappelé les limites des analyses précédentes, notamment celle de Ageno en 2008, où les études ayant servis à la méta-analyse étaient de faible puissance (études cas-témoins, études de cohorte) et surtout l'absence d'ajustement des résultats à d'importants facteurs confondants comme l'âge et l'obésité. Ainsi, Mahmoodi et al. ont proposé une autre méta-analyse mais basée sur les données individuelles des patients et uniquement pour ceux issus d'études prospectives. Cette étude a ainsi analysé 244 865 participants pour 4910 évènements de MVTE issus de 9 études prospectives. Leur conclusion fut sans appel, avec une absence d'association significative entre les FRCV et la MVTE non provoquée (en dehors du tabagisme associé au risque de MVTE provoquée).

Au final, le débat reste toujours entier : qu'en est-il de la place des FRCV dans le risque de survenue de MVTE non provoquée ?

Le cumul des FRCV d'athérosclérose est significativement associé au risque de MVTE non provoquée

La réponse à la question précédente restant un enjeu en pratique clinique courante, nous avons mené notre propre étude au sein du service d'hypertension et maladies vasculaires au CHRU de Strasbourg. L'analyse a porté sur des patients non sélectionnés hospitalisés consécutivement pour un épisode de MVTE dans ce service et inclus de manière prospective dans le registre REMOTEV (148). Puisque le risque individuel de chaque FRCV à être associé à la MVTE non provoquée est débattu, nous avons émis l'hypothèse que le cumul des FRCV pouvait influencer le risque de survenue d'une thrombose veineuse non provoquée, tout comme le cumul des FRCV augmente le risque cardiovasculaire global. Nous avons ainsi inclus les 515 premiers patients ayant pu bénéficier de 6 mois de suivi. Après une première analyse univariée puis multivariée concernant le risque individuel des FRCV associés à la MVTE non provoquée, nous avons finalement obtenus des résultats similaires aux grandes études de cohorte longitudinales avec l'absence d'association significative entre les FRCV et le risque de MVTE non provoquée, en dehors du diabète (OR 1.82) et de l'âge (OR 1.79) (35,145). Par contre, les résultats étaient très différents lorsque l'on considérait le cumul des FRCV. En effet, nous avons montré qu'un FRCV (quel qu'il soit) est associé à la MVTE non provoquée avec un OR de 3, deux FRCV avec un OR de 4.33, et 3 FRCV ou plus avec un OR de 4.58. Ces résultats sont en cohérence avec la littérature puisque si nous ne retrouvons pas l'association FRCV-

MVTE pour un FRCV donné, nous l'objectivons pour leur cumul, comme ce qui a été montré pour le syndrome métabolique. En effet, le syndrome métabolique constitue la seule entité de surrisque cardiovasculaire pour laquelle le lien FRCV-MVTE a été montré et, à notre connaissance, jamais contredit (30,38,149,150). Ce n'est pas tant le syndrome métabolique en soi que le cumul de FRCV qu'il représente qui pourrait être associé à la MVTE non provoquée, tout comme ce qui a été montré dans notre travail.

Une des particularités de notre étude est d'avoir associé le cumul des FRCV (en additionnant le nombre de FRCV, allant de 0, 1, 2 à 3 ou plus) avec la gravité de l'embolie pulmonaire puisque nous avons observé significativement plus d'embolie pulmonaire de risque intermédiaire-haut ou à haut risque (c'est-à-dire avec des signes de souffrance myocardique comme la dilatation des cavités droites, l'augmentation des taux de BNP ou de troponine I) avec le cumul des FRCV. A notre connaissance, il s'agit de la première étude faisant état de cette corrélation. Il nous reste à démontrer comment le cumul des FRCV peut exposer le patient à une embolie pulmonaire de gravité plus importante. Une hypothèse à évoquer est l'atteinte cardiaque infraclinique secondaire au risque cardiovasculaire global, ne permettant pas au patient de compenser l'augmentation des pressions droites, la diminution de la pré-charge du ventricule gauche et la tachycardie, secondaires à l'embolie pulmonaire. Des travaux complémentaires doivent être menés pour mieux établir ce lien cumul des FRCV – gravité de la MVTE.

Dans notre étude, nous avons également montré que le lien cumul des FRCV – MVTE persistait dans le risque de récurrence de MVTE dans les 6 mois suivant un épisode de thrombose veineuse, malgré la mise en place d'un traitement anticoagulant de fond. Cette relation était graduelle avec le nombre de FRCV cumulés pour un patient donné, mais sans possibilité de lui attribuer

une significativité statistique devant le faible nombre d'évènements, probablement lié à la courte durée de suivi. Il reste à démontrer que la pression des FRCV exercée sur le système vasculaire veineux mène à la constitution d'un thrombus pour lequel un traitement anticoagulant instauré en prévention de la récurrence soit moins efficace et quelles en seraient les explications.

Ces considérations suggèrent que les FRCV exercent un rôle pro-thrombotique qui ne passe pas exclusivement par la génération de thrombine *via* la cascade de coagulation, partiellement inhibée par le traitement anticoagulant mis en place. Une hypothèse serait que les FRCV, comme dans l'artère, induisent un stress au niveau de la paroi vasculaire pouvant faire le lit de la maladie thrombotique veineuse, *a fortiori via* l'endothélium, incomplètement contrebalancé par un traitement anticoagulant conventionnel. Cette hypothèse mérite d'être explorée en pré-clinique pour la compréhension des mécanismes sous-jacents.

Au total, les résultats originaux de notre étude méritent d'être confirmés par une étude clinique prospective de plus grande ampleur avec un suivi longitudinal d'une durée plus longue afin de confirmer les liens évoqués. Dans cette étude complémentaire, il serait également intéressant d'analyser le traitement médicamenteux des FRCV en place au moment de l'évènement index et l'atteinte (ou non) de l'objectif thérapeutique pour chaque FRCV. Cela permettrait d'estimer le risque résiduel d'un facteur de risque cardiovasculaire sur la survenue d'un évènement cardiovasculaire (veineux ou artériel) malgré l'instauration d'une thérapeutique pharmacologique.

Etudes pré-cliniques de l'impact des facteurs de risque cardiovasculaires majeurs d'athérosclérose sur la fonction endothéliale de l'artère et de la veine fémorale dans l'estimation du risque de thrombose veineuse

Nous avons pu mettre en évidence dans notre étude clinique qu'un lien existait entre le cumul des FRCV, le risque de MVTE non provoquée et la gravité de l'embolie pulmonaire. Nous avons également montré une augmentation du risque de récurrence de MVTE dans les 6 mois qui suivaient l'épisode index, graduellement au nombre de FRCV, alors même que les patients bénéficiaient d'un traitement anticoagulant. Le lien physiopathologique entre FRCV et MVTE étant inconnu et devant l'insuffisance du traitement anticoagulant conventionnel dans la prévention de la récurrence de la thrombose veineuse chez les patients ayant le plus de FRCV, nous avons émis l'hypothèse qu'une pression soit exercée par les FRCV sur une autre voie d'induction de la thrombose que celle passant par la cascade de coagulation et la génération de thrombine. Puisque les FRCV agissent sur la paroi artérielle en induisant une dysfonction endothéliale faisant le lit des MCV artérielles, nous supposons que les FRCV agissent également sur la paroi veineuse en induisant une dysfonction endothéliale pouvant possiblement intervenir dans le risque de thrombose veineuse.

Afin de comprendre comment les FRCV peuvent agir sur la fonction endothéliale veineuse, nous avons développés 3 études pré-cliniques portant sur la fonction endothéliale en nous intéressant à la veine fémorale. Nous avons choisi la veine fémorale puisqu'en pratique de soins courant, la thrombose veineuse profonde survient très majoritairement dans les veines

des membres inférieurs : particularité anatomique ? Exposition à un risque lié à l'environnement et à l'hygiène de vie ? Particularités fonctionnelles des veines des membres inférieurs vis-à-vis des autres territoires veineux ? La réponse n'est pas connue à ce jour. Afin de ne pas faussement transposer des conclusions physiopathologiques issues de l'étude d'un autre territoire veineux (en particulier la veine mésentérique ou la veine jugulaire, plus communément utilisées) à la MVTE, nous avons réalisé nos 3 études pré-cliniques sur la veine fémorale en la comparant à l'artère fémorale, pour laquelle l'influence des FRCV devrait être connue selon les données de la littérature.

Nous avons testé 3 hypothèses successives :

- 1) Puisque l'âge est le facteur de risque indépendant et commun aux MCV et à la MVTE, nous avons supposé que le vieillissement s'accompagne d'une dysfonction endothéliale au niveau de la veine fémorale chez le rat Wistar
- 2) Le cumul des FRCV étant lié à la MVTE, nous avons supposé que la fonction endothéliale de la veine fémorale soit altérée chez le rat ZSF1, modèle de syndrome métabolique cumulant les FRCV, à un âge jeune pour ne pas intégrer les effets liés au vieillissement
- 3) Suite à la mise en évidence par les deux premières études d'un mécanisme impliquant le métabolisme de l'acide arachidonique, nous avons voulu savoir si la modulation de son métabolisme par des acides gras polyinsaturés pouvait se répercuter sur la fonction endothéliale de l'artère et de la veine fémorale chez le rat vieillissant.

Effets du vieillissement physiologique sur la fonction endothéliale de la veine fémorale comparativement à l'artère chez le rat Wistar

Le vieillissement s'accompagne d'un remodelage artériel, d'une augmentation de la rigidité artérielle, d'une dégradation des fibres élastiques et d'une altération de l'endothélium menant à l'installation d'une dysfonction endothéliale conduisant aux MCV (151). Le vieillissement veineux est cependant très peu étudié et très peu de données sont disponibles (151). Le concept de phlébosclérose a été évoqué, résultant d'un épaissement pariétal de la veine, à potentiel pro-thrombogène, sans toutefois qu'une explication ne soit apportée sur les mécanismes physiopathologiques sous-jacents ou l'existence d'une dysfonction endothéliale veineuse (85,86).

Nos travaux ont montré que le vieillissement de l'artère fémorale s'accompagne d'une altération de la fonction endothéliale avec une diminution de la relaxation médiée par l'acétylcholine, initialement COX-dépendante chez les rats moyennement âgés, et une génération d'EDCF. Chez les rats âgés de 18 mois, cette altération de la relaxation est secondaire à un double mécanisme, COX-dépendant et COX-indépendant. Nous avons montré de manière parallèle que, lors du vieillissement, l'artère fémorale perd rapidement sa composante EDH, concomitamment à une diminution de sa sensibilité au NO. Ces phénomènes ont déjà été observés dans différents territoires artériels chez plusieurs espèces animales (152,153). L'artère fémorale répond aux mêmes mécanismes de vieillissement.

Dans notre étude et à notre connaissance pour la première fois, nous avons pu démontrer que le vieillissement physiologique chez le rat Wistar induisait une dysfonction endothéliale au

niveau de la veine fémorale. Nous avons pu observer que cette dysfonction se traduisait par une altération âge-dépendante de la relaxation endothélium-dépendante d'anneaux de veines fémorales en réponse à des concentrations croissantes d'acétylcholine dès 10 mois d'âge chez le rat. Cette altération de la relaxation s'accompagnait d'une vasoconstriction âge-dépendante aux concentrations les plus fortes d'acétylcholine, correspondant à la génération de facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF). Par l'utilisation d'indométhacine, un inhibiteur non sélectif des cyclooxygénases (COX), nous avons montré que cette altération de la relaxation endothéliale de la veine fémorale était purement COX-dépendante. En effet, l'inhibition non sélective des COX permettait de restaurer la relaxation endothélium-dépendante et d'abolir la composante EDCF, même chez les rats les plus âgés, contrairement à l'artère fémorale. Par opposition à l'artère fémorale, nous avons également pu observer que le vieillissement veineux s'accompagne du maintien de la composante EDH et d'une augmentation de la sensibilité des cellules musculaires lisses au NO, possiblement par mécanisme de compensation. A notre connaissance, il s'agit de la première description de ce phénomène dans le vieillissement de la veine fémorale.

Par l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs TP, le S18886, nous avons montré que les prostanoïdes générés au cours du vieillissement étaient exclusivement des agonistes des récepteurs TP dans la veine fémorale, puisque son utilisation a permis de restaurer la relaxation endothélium-dépendante et d'abolir les EDCF. L'augmentation de prostanoïdes agonistes des récepteurs TP ont déjà été décrits dans le vieillissement artériel au niveau de l'aorte de rats hypertendus ou dans l'artère mésentérique, mais pas dans la veine (154,155). Cette caractéristique du vieillissement veineux d'être accompagnée par la génération exclusive d'EDCF agonistes des récepteurs TP, pourrait expliquer en partie un surrisque de thrombose veineuse lié à l'âge. En effet, la stimulation des récepteurs TP induit une activation

puis une agrégation plaquettaire, une contraction des cellules musculaires lisses et au niveau endothélial l'expression de molécules d'adhésion ou la facilitation de la diapédèse leucocytaire, la résultante étant un état pro-thrombogène (73,156). Pourtant, contrairement au thrombus artériel, le thrombus veineux est considéré comme étant pauvre en plaquettes. Il a cependant été montré que la thrombose veineuse *in vivo* peut être réduite par l'utilisation d'un antagoniste sélectif des COX-2 (SQ29548) dans un modèle de ligature de la veine cave inférieure chez la souris et que le thrombus veineux était donc bien en partie plaquettes-dépendant (157).

Lors des analyses immunohistochimiques, nous avons pu mettre en évidence une localisation purement endothéliale de la COX-1 et de la COX-2, que ce soit au niveau de l'artère ou de la veine fémorale, quel que soit l'âge. Ces résultats sont surprenants puisque COX-1 et COX-2, même si elles sont exprimées majoritairement au niveau endothélial, sont en général observées dans l'ensemble de la paroi vasculaire, en particulier au niveau des cellules musculaires lisses (158–160). A notre connaissance, seule une étude de De Witt en 1983 a montré une localisation quasi endothéliale pure de la PGH synthase au niveau des cellules endothéliales d'artères rénales bovines (161). Une hypothèse serait que les COX soient exprimées très majoritairement dans l'endothélium dans une artère saine et au niveau de la paroi vasculaire en situation pathologique (73). Ce n'est probablement pas le cas et il ne s'agit vraisemblablement pas d'une particularité liée à l'espèce animale, puisque nous avons complété nos analyses avec la localisation des COX dans l'aorte des rats de notre étude et avons pu objectiver la présence de COX-1 et de COX-2 dans l'ensemble des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire, y compris chez les rats jeunes. Cette localisation endothéliale fémorale pure des COX à tous les âges chez les rats Wistar traduit une particularité fonctionnelle de ces vaisseaux qu'on ne pourrait transposer à d'autres territoires

vasculaires. Cette constatation a conforté le choix de l'étude des vaisseaux fémoraux pour l'analyse des mécanismes de la thrombose veineuse des membres inférieurs.

Afin de relier la dysfonction endothéliale COX-dépendante à l'expression tissulaire des COX, nous avons réalisé une analyse semi-quantitative de l'expression de COX-1 et de COX-2 dans les vaisseaux fémoraux par immuno-fluorescence, en comparaison à l'aorte. Le vieillissement est associé à une augmentation progressive et significative de l'expression de COX-1 dans l'aorte, l'artère et la veine fémorale. Par contre, nous avons constaté une diminution de l'expression de COX-2 chez les rats âgés comparativement aux rats jeunes, à la fois dans l'aorte mais aussi dans les vaisseaux fémoraux. Ce résultat va à l'encontre de ce qui a été observé dans les artères fémorales par Shi et al. en 2008, où la quantification de COX-2 était significativement augmentée en Western Blot dans les artères fémorales de rats âgés de 12 mois comparativement à des rats de 5 mois (153). La différence avec notre étude est que nos rats jeunes n'étaient âgés que de 3 mois. Peut-être que l'expression de COX-2 est plus importante à un âge très jeune. Cette hypothèse peut être renforcée par l'étude de Guevara-Balcazar (2017) qui a montré que l'expression de COX-1 augmentait avec l'âge et que l'expression de COX-2 en Western Blot était plus importante dans l'aorte thoracique de rats prépubères et jeunes comparativement à des rats âgés, contrairement à l'aorte abdominale ou au myocarde où l'expression de COX-2 diminuait avec l'âge (162). Or, nous avons utilisé dans nos travaux immuno-histologiques l'aorte thoracique, traduisant encore une fois la différence entre les territoires vasculaires.

En résumé, notre travail a montré que la veine fémorale présente une dysfonction endothéliale âge-dépendante, tout comme l'artère fémorale. A la différence de l'artère, la veine fémorale présente une dysfonction endothéliale exclusivement COX-dépendante et

associée à la génération de prostanoïdes agonistes des récepteurs TP, lui conférant une capacité pro-thrombogène. Cette dysfonction endothéliale COX-dépendante était associée à une augmentation de l'expression de COX-1 et une diminution de l'expression de COX-2 dans l'artère et la veine fémorale, toutes deux de localisation purement endothéliale.

Ces résultats doivent être complétés par des expériences menant à la preuve du caractère pro-thrombogène de la dysfonction endothéliale veineuse, notamment via l'évaluation de l'expression du facteur tissulaire, des tests d'activation et d'agrégation plaquettaire, ou l'utilisation de modèles animaux de thrombose veineuse. Cette analyse doit également être complétée par l'étude du stress oxydant exprimé au niveau fémoral et des acteurs de l'inflammation, y compris dans le tissu adipeux péri-vasculaire.

Effets du cumul des facteurs de risque cardiovasculaires sur la fonction endothéliale de la veine fémorale comparativement à l'artère chez le rat ZSF1

Après avoir démontré que l'âge, facteur de risque de MCV artérielles et de MVTE, induisait une dysfonction endothéliale possiblement pro-thrombogène au niveau de la veine fémorale, nous avons souhaité étudier les effets du cumul des FRCV sur la veine fémorale chez un rat jeune pour ne pas intégrer les effets du vieillissement dans les résultats. Nous avons pour cela choisi le rat ZSF1, qui est un modèle de syndrome métabolique cumulant une obésité, une hypertension artérielle, un diabète de type II et une dyslipidémie. Nous n'avons pas choisi le

rat ZDF, modèle se rapprochant plus du diabète de type I, qui de surcroît ne cumule pas l'obésité et l'hypertension artérielle en sus du diabète.

Dans notre étude, nous avons montré que malgré un âge jeune de 20 semaines, les FRCV associés au rat ZSF1 obèse induisent une dysfonction endothéliale sévère dans l'artère fémorale. Cette dysfonction endothéliale représentée par une altération marquée de la relaxation induite par l'acétylcholine est similaire à celle des rats Wistar âgés de 18 mois de la précédente étude. L'utilisation d'indométhacine a permis de supprimer la composante EDCF, sans restauration complète de la relaxation endothéliale, traduisant bien un double mécanisme, COX-dépendant et COX-indépendant. Dans la veine fémorale, nous avons également observé une dysfonction endothéliale chez le rat ZSF1 obèse avec une diminution de la relaxation médiée par l'acétylcholine et accompagnée d'une très importante génération d'EDCF, totalement abolie par l'indométhacine avec restauration complète de la relaxation. Tout comme dans le vieillissement fémoral, nous avons encore une fois mis en évidence le rôle central des COX dans la dysfonction endothéliale associée aux FRCV.

Dans la précédente étude, nous avons pu montrer une différence dans l'expression de COX-1 et de COX-2 en fonction de l'âge. Nous avons ainsi étudié la relaxation endothélium-dépendante des vaisseaux fémoraux en inhibant sélectivement la COX-1 ou la COX-2. Nous avons ainsi pu démontrer que COX-1 et COX-2 n'étaient pas impliquées de la même manière dans la dysfonction endothéliale entre l'artère et la veine fémorale et sous le poids du cumul des FRCV. En effet, nous avons objectivé dans l'artère fémorale du rat ZSF1 contrôle (lean) que l'altération de la relaxation endothélium-dépendante était quasi exclusivement secondaire à COX-1 puisque son inhibition permettait une restauration de la relaxation alors que l'inhibition de COX-2 ne modifiait pas la relaxation. Sous le poids des FRCV dans le rat ZSF1

obèse, l'inhibition de COX-1 ne modifiait pas la relaxation alors que l'inhibition de COX-2 aggravait l'altération de la relaxation avec une augmentation significative de la composante EDCF. Cet effet traduit bien une modification induite par les FRCV dans la voie de métabolisation de l'acide arachidonique par les COX avec une diminution du rôle délétère de COX-1 et un rôle protecteur de COX-2. Cet effet protecteur de COX-2 en situation pathologique a déjà été objectivé chez l'homme ou l'étude *ex vivo* de la relaxation induite par la bradykinine d'artères coronaires de patients diabétiques était altérée par l'inhibition de COX-2 (159). Il a également été montré que COX-2 protégeait la cellule endothéliale de l'apoptose secondaire au tabagisme, un autre FRCV (163). Ce rôle de protecteur au niveau des artères a également été suspecté en clinique puisque les traitements anti-inflammatoires inhibiteurs sélectifs de COX-2, comme le celecoxib, étaient responsables d'effets indésirables graves avec la survenue d'évènements cardiovasculaires, en particulier d'infarctus du myocarde (164). La vraisemblable génération de prostanoïdes vasodilatateurs COX-2 dépendante, suggérée par notre étude de vasoréactivité en cas de cumul de FRCV, était accompagnée par une diminution de son expression au niveau fémoral, pouvant expliquer en partie le déséquilibre existant entre les prostanoïdes vasodilatateurs et vasoconstricteurs sous le poids des FRCV.

Concernant la veine fémorale, les mécanismes sont différents de ceux que nous avons décrits pour l'artère. En effet, nous avons pu mettre en évidence qu'en l'absence de FRCV, la fonction endothéliale de la veine fémorale chez le rat ZSF1 contrôle était altérée via un mécanisme COX-2 dépendant, soit inverse de celui constaté dans l'artère. Sous le poids des FRCV, COX-1 et COX-2 étaient à l'origine d'une importante altération de la relaxation endothélium-dépendante avec importante génération d'EDCF. Chez le rat ZSF1 obèse, l'inhibition d'une COX était contrebalancée par les effets délétères de la seconde. Malgré une diminution significative de l'expression de COX-1 et de COX-2 de la veine fémorale dans nos analyses en

immuno-fluorescence, il apparaît que, contrairement à l'artère, une COX ne compense pas l'autre, avec génération de prostanoïdes vasoconstricteurs responsables de la dysfonction endothéliale.

Si les FRCV contribuent à la génération de la thrombose veineuse *via* une dysfonction endothéliale médiée par des prostanoïdes vasoconstricteurs (et donc potentiellement pro-thrombogènes), il serait alors possible de les identifier ou de les mesurer lors de la survenue d'une thrombose veineuse non provoquée chez l'homme. Une réponse à cette interrogation a en partie été fournie par les travaux de Klotz et al. (1984), qui ont montré qu'à la phase aiguë d'une thrombose veineuse profonde des membres inférieurs, l'excrétion urinaire de thromboxane B₂ (métabolite inactif du thromboxane A₂) était augmentée (165), traduisant bien l'augmentation de la génération de prostanoïdes pro-thrombogènes lors de la survenue d'une thrombose veineuse.

L'ensemble de ces données ne sont pas transposables en l'état à l'homme puisqu'une caractéristique des vaisseaux humains est le développement de l'athérome que nous ne retrouvons pas chez l'animal, en particulier le rat, même à un âge très avancé ou soumis à la pression des FRCV. Nous ne savons pas quels pourraient être les effets de l'athérosclérose sur la génération de composés pouvant induire « à distance » un risque de thrombose veineuse. En effet, l'athérosclérose est associée à l'activation des plaquettes, l'activation de la coagulation et l'augmentation du turn over de la fibrine (166–169). Ces facteurs pro-coagulants générés dans le système artériel pourraient provoquer une TVP dans certaines conditions dans le système veineux (170).

En résumé, nos résultats argumentent en faveur du lien FRCV-MVTE que nous avons pu objectiver dans notre étude clinique, avec une dysfonction endothéliale de la veine fémorale

COX-dépendante secondaire aux effets du cumul des FRCV chez le rat ZSF1 obèse. Cette dysfonction endothéliale veineuse impliquant les COX-1 et -2 paraît être l'élément clef. Ces travaux doivent être poursuivis par l'identification des prostanoides générés en situation de stress vasculaire sous l'effet du cumul des FRCV, notamment par une analyse lipidomique du profil des eicosanoïdes plasmatiques afin d'identifier les agents impliqués dans cette dysfonction endothéliale. Tout comme notre étude sur le vieillissement veineux, nous devons compléter nos données par une analyse des facteurs pro-thrombotiques (expression du facteur tissulaire, microparticules circulantes exprimant le facteur tissulaire ou pro-sénescentes), du stress oxydant et des voies de l'inflammation.

Effets d'un traitement par une formulation optimisée d'oméga-3 (EPA:DHA 6:1) sur la fonction endothéliale de la veine fémorale comparativement à l'artère chez le rat vieillissant Wistar.

Dans nos travaux précédents, nous avons montré que l'âge et les FRCV induisaient une dysfonction endothéliale au niveau de la veine fémorale, potentiellement pro-thrombogène, dont les éléments clefs sont les cyclooxygénases. Nous avons suggéré à travers notre étude clinique que plus les patients cumulaient les FRCV, plus le risque de récurrence de MVTE sous traitement anticoagulant était important, pouvant traduire un mécanisme délétère étant insuffisamment contrôlé par un antivitamine K ou plus fréquemment un anti-Xa, inhibiteurs de la génération de thrombine. Le métabolisme de l'acide arachidonique par les

cyclooxygénases étant au centre de la dysfonction endothéliale de la veine fémorale, nous avons émis l'hypothèse qu'un traitement par une formulation optimisée d'oméga-3 (EPA:DHA 6:1) pouvait moduler le métabolisme de l'acide arachidonique et donc diminuer la génération de prostanoides vasoconstricteurs et pro-thrombogènes. En effet, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) inhibe de manière compétitive la libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires par la phospholipase A₂ ainsi que son oxygénation par les COX (122,123). L'EPA va ainsi conduire à la formation de prostanoides de la série 3 sous l'action enzymatique des COX (comme la PGI₃ ou le thromboxane A₃), qui ont la particularité d'être plus vasodilatateurs et moins pro-thrombogènes que les prostanoides de série 2 issus du métabolisme de l'acide arachidonique (124). Nous avons choisi de tester cette hypothèse chez le rat Wistar moyennement âgé (10 mois), qui présente déjà une dysfonction endothéliale fémorale, comme montrée dans notre étude précédente.

Nos résultats ont révélé qu'un traitement oral par formulation optimisée d'oméga-3 (EPA:DHA 6:1, dont le ratio en EPA six fois supérieur au DHA a montré une meilleure protection vasculaire) réduisait la dysfonction endothéliale exprimée au niveau des vaisseaux fémoraux chez le rat moyennement âgé, comparativement à un groupe traité par EPA:DHA 1:1 et à deux groupes contrôles, gavés ou non à l'huile de maïs, riche en oméga-6. En effet, si le traitement par EPA:DHA 6:1 n'a pas amélioré la relaxation maximale induite par l'acétylcholine au niveau d'anneaux d'artères fémorales, la vasoconstriction secondaire à l'action des EDCF était significativement réduite. Dans la veine, l'EPA:DHA 6:1 a permis d'augmenter significativement la relaxation induite par l'acétylcholine comparativement aux rats contrôles ou traités par EPA:DHA 1:1.

Puisque nous avons mis en évidence dans l'étude précédente que COX-1 et COX-2 n'étaient pas impliqués de la même manière dans le métabolisme de l'acide arachidonique, nous avons voulu savoir si l'EPA:DHA 6:1 modifiait les réponses vasomotrices lors de l'inhibition sélective de COX-1 ou de COX-2. Nous avons pu montrer que les rats traités par EPA:DHA 6:1 ne modifiaient pas la relaxation acétylcholine-dépendante lors de l'inhibition de COX-1 dans la veine fémorale. Par contre, l'EPA:DHA 6:1 a significativement modifié la relaxation des veines fémorales en augmentant la part de prostanoides vasodilatateurs, lors de l'inhibition de COX-2. Ces résultats suggèrent que l'EPA:DHA 6:1 a des effets positifs sur la relaxation de la veine fémorale, liés à la génération de prostanoides moins vasoconstricteurs issus de l'activité enzymatique de la COX-2.

Nos constatations sont cohérentes avec les données de la littérature concernant le rôle de COX-2 dans la protection conférée par les oméga-3. En effet, la COX-2, contrairement à COX-1, participe à la formation d'EFOX (electrophilic fatty acids oxo-derivatives) issus du métabolisme des oméga-3, molécules bioactives ayant la propriété d'activer l'expression génique de produits anti-oxydants dépendant de la voie Nrf2 ainsi que d'être des agonistes des récepteurs PPAR γ (proliferator-activated-receptor- γ , récepteur nucléaire dont l'activation est impliqué dans la lipolyse et la diminution de l'insulinorésistance) et d'inhiber la formation de cytokines pro-inflammatoires via la voie NF- κ B (171–174). Ces EFOX sont produits notamment par les macrophages activés. Ainsi, il apparaît essentiel de compléter nos données, initialement par l'analyse des voies de l'inflammation au niveau tissulaire mais aussi au niveau plasmatique en complément des analyses lipidomiques.

L'effet protecteur conféré par les oméga-3 permettrait ainsi d'être un complément thérapeutique au traitement anticoagulant à envisager pour la prévention de la MVTE. La

réduction du risque de MVTE par un régime riche en oméga-3 a déjà été montrée chez l'homme par Reiner et son équipe (2017) (175). En effet, les auteurs ont montré à travers un registre de patients de plus de 65 ans ayant présenté un épisode de MVTE, qu'un régime alimentaire riche en oméga-3 était associé de manière significative à une réduction de plus de 60% du risque de récurrence de thrombose veineuse et à une diminution de la mortalité totale, sans augmenter le risque hémorragique.

En résumé, nos travaux ont montré qu'il est possible d'influencer le métabolisme de l'acide arachidonique dans la veine fémorale par un traitement oral d'oméga-3 (EPA:DHA 6:1) vers la génération de prostanoïdes moins vasoconstricteurs sous l'action de la COX-2, conférant possiblement un effet moins thrombogène prostanoïde-dépendant. En complément des données de la littérature, le traitement par oméga-3 constitue un traitement adjuvant potentiel au traitement anticoagulant pour la prévention de la récurrence de MVTE.

Conclusion

La maladie veineuse thrombo-embolique est la 3^e pathologie cardiovasculaire la plus fréquemment rencontrée, responsable de décès et de séquelles lourdes que sont le cœur pulmonaire chronique ou le syndrome post thrombotique aux membres inférieurs. Puisque près de la moitié des évènements thrombotiques demeurent inexpliqués, l'identification des facteurs de risque de la maladie et la compréhension de sa physiopathologie sont capitales pour la prévention de la maladie et de sa récurrence. Nous avons ainsi pu démontrer que les facteurs de risque cardiovasculaires majeurs d'athérosclérose, associés aux maladies cardiovasculaires artérielles, étaient en lien avec un surrisque de thrombose veineuse non provoquée. Ce lien qui était débattu dans la littérature a trouvé son explication dans le risque de thrombose veineuse conféré par le cumul des facteurs de risque cardiovasculaires, plus que leur risque individuel. Nous avons également montré que le cumul des facteurs de risque cardiovasculaire était associé à une plus grande sévérité de l'embolie pulmonaire et à une augmentation du risque de récurrence de thrombose veineuse dans les 6 mois suivant l'épisode index. Afin de comprendre cette association, nous avons développé un modèle d'étude de la fonction endothéliale de l'artère et de la veine fémorale chez le rat. Le vieillissement de la veine fémorale s'accompagne d'une dysfonction endothéliale COX-dépendante avec production de facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium agonistes des récepteurs TP, au potentiel pro-thrombogène. Chez le rat ZSF1 obèse cumulant les facteurs de risque cardiovasculaire, la veine fémorale présente une dysfonction endothéliale COX-dépendante à un âge jeune, assimilable à un vieillissement prématuré, liée à la génération de prostanoïdes vasoconstricteurs issus de l'action enzymatique de COX-1 et de COX-2 de localisation

purement endothéliale. Un traitement par oméga-3 (EPA:DHA 6:1) est capable de moduler le métabolisme de l'acide arachidonique par la COX-2 chez le rat vieillissant en améliorant la relaxation de la veine fémorale par la génération de prostanoides plus vasodilatateurs et en réduisant les facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium artériel. Ce travail ouvre une piste intéressante dans le traitement préventif de la thrombose veineuse associée à l'augmentation du risque cardiovasculaire global, en plaçant les oméga-3 en traitement adjuvant à l'anticoagulation conventionnelle.

References

1. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost.* 2000 May;83(5):657–60.
2. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med.* 1998 Mar 23;158(6):585–93.
3. Heit JA. Epidemiology of venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol.* 2015 Aug;12(8):464–74.
4. Anderson FA, Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, et al. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Arch Intern Med.* 1991 May;151(5):933–8.
5. Olié V, Fuhrman C, Chin F, Lamarche-Vadel A, Scarabin P-Y, de Peretti C. Time trends in pulmonary embolism mortality in France, 2000-2010. *Thromb Res.* 2015 Feb;135(2):334–8.
6. Gaertner S, Piémont A, Faller A, Bertschy G, Hallouche N, Mirea C, et al. Incidence and risk factors of venous thromboembolism: Peculiarities in psychiatric institutions. *Int J Cardiol.* 2017 Aug 2;
7. Cheuk BLY, Cheung GCY, Cheng SWK. Epidemiology of venous thromboembolism in a Chinese population. *Br J Surg.* 2004 Apr;91(4):424–8.
8. Zakai NA, McClure LA, Judd SE, Safford MM, Folsom AR, Lutsey PL, et al. Racial and regional differences in venous thromboembolism in the United States in 3 cohorts. *Circulation.* 2014 Apr 8;129(14):1502–9.
9. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation.* 2003 Jun 17;107(23 Suppl 1):I4-8.
10. White RH, Keenan CR. Effects of race and ethnicity on the incidence of venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2009;123 Suppl 4:S11-17.
11. Prandoni P, Lensing AW, Cogo A, Cuppini S, Villalta S, Carta M, et al. The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med.* 1996 Jul 1;125(1):1–7.
12. Cushman M, Tsai AW, White RH, Heckbert SR, Rosamond WD, Enright P, et al. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Am J Med.* 2004 Jul 1;117(1):19–25.
13. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost.* 2007 Apr;5(4):692–9.
14. Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: a question of attribution. *Br J Haematol.* 2008 Oct;143(2):180–90.

15. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, Danchin N, Fitzmaurice D, Galiè N, et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 2014 Nov 14;35(43):3033–3069, 3069a–3069k.
16. Pedrajas JM, Garmendia C, Portillo J, Gabriel F, Mainez C, Yera C, et al. Idiopathic versus secondary venous thromboembolism. Findings of the RIETE registry. *Rev Clin Esp*. 2014 Oct;214(7):357–64.
17. Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, Agnelli G, Galiè N, Pruszczyk P, et al. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2008 Sep;29(18):2276–315.
18. Riva N, Donadini MP, Ageno W. Epidemiology and pathophysiology of venous thromboembolism: similarities with atherothrombosis and the role of inflammation. *Thromb Haemost*. 2015 Jun;113(6):1176–83.
19. Sarvananthan T, Das S. Thrombosis: simplified. *Phlebology*. 2012;27 Suppl 2:12–22.
20. He R, Chen D, He S. Factor XI: hemostasis, thrombosis, and antithrombosis. *Thromb Res*. 2012 May;129(5):541–50.
21. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Aug;27(8):1687–93.
22. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014 Sep;58(5):515–23.
23. Contino PB, Andree HA, Nemerson Y. Flow dependence of factor X activation by tissue factor-factor VIIa. *J Physiol Pharmacol*. 1994 Mar;45(1):81–90.
24. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis*. 2003 Oct;16(1–2):17–20.
25. Heemskerk JWM, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002 Aug;88(2):186–93.
26. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3527–61.
27. Oliver JA, Monroe DM, Church FC, Roberts HR, Hoffman M. Activated protein C cleaves factor Va more efficiently on endothelium than on platelet surfaces. *Blood*. 2002 Jul 15;100(2):539–46.
28. Sim D, Flaumenhaft R, Furie B, Furie B. Interactions of platelets, blood-borne tissue factor, and fibrin during arteriolar thrombus formation in vivo. *Microcirculation*. 2005 May;12(3):301–11.
29. Byrnes JR, Wolberg AS. Red blood cells in thrombosis. *Blood*. 2017 Oct 19;130(16):1795–9.
30. Ageno W, Prandoni P, Romualdi E, Ghirarduzzi A, Dentali F, Pesavento R, et al. The metabolic syndrome and the risk of venous thrombosis: a case-control study. *J Thromb Haemost*. 2006 Sep;4(9):1914–8.

31. Hansson PO, Eriksson H, Welin L, Svärdsudd K, Wilhelmsen L. Smoking and abdominal obesity: risk factors for venous thromboembolism among middle-aged men: "the study of men born in 1913." *Arch Intern Med.* 1999 Sep 13;159(16):1886–90.
32. Mi Y, Yan S, Lu Y, Liang Y, Li C. Venous thromboembolism has the same risk factors as atherosclerosis: A PRISMA-compliant systemic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016 Aug;95(32):e4495.
33. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, Bernardi E, Petrobelli F, Lensing AWA, et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2003 Apr 10;348(15):1435–41.
34. Severinsen MT, Kristensen SR, Johnsen SP, Dethlefsen C, Tjønneland A, Overvad K. Smoking and venous thromboembolism: a Danish follow-up study. *J Thromb Haemost.* 2009 Aug;7(8):1297–303.
35. Wattanakit K, Lutsey PL, Bell EJ, Gornik H, Cushman M, Heckbert SR, et al. Association between cardiovascular disease risk factors and occurrence of venous thromboembolism. A time-dependent analysis. *Thromb Haemost.* 2012 Sep;108(3):508–15.
36. Ageno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. *Circulation.* 2008 Jan 1;117(1):93–102.
37. Mahmoodi BK, Cushman M, Anne Næss I, Allison MA, Bos WJ, Brækkan SK, et al. Association of Traditional Cardiovascular Risk Factors With Venous Thromboembolism: An Individual Participant Data Meta-Analysis of Prospective Studies. *Circulation.* 2017 03;135(1):7–16.
38. Franchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. The metabolic syndrome and the risk of arterial and venous thrombosis. *Thromb Res.* 2008;122(6):727–35.
39. Dentali F, di Minno MN, Gianni M, di Minno G, Squizzato A, Ageno W. The role of the metabolic syndrome in patients with provoked venous thromboembolic events. *Thromb Haemost.* 2013 Apr;109(4):759–61.
40. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000 Oct;44(2):333–40.
41. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980 Nov 27;288(5789):373–6.
42. Godo S, Shimokawa H. Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Sep;37(9):e108–14.
43. Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.* 2010 May;459(6):807–16.
44. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:235–76.
45. Forstermann U. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation.* 2006 Apr 4;113(13):1708–14.
46. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015 Oct;129(2):83–94.

47. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999 Jun 10;399(6736):601–5.
48. Vanhoutte PM, Zhao Y, Xu A, Leung SWS. Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ Res*. 2016 Jul 8;119(2):375–96.
49. Vanhoutte PM. Vascular physiology: the end of the quest? *Nature*. 1987 Jun 11;327(6122):459–60.
50. Kelton JG, Blajchman MA. Prostaglandin I₂ (prostacyclin). *Can Med Assoc J*. 1980 Jan 26;122(2):175–9.
51. Majed BH, Khalil RA. Molecular Mechanisms Regulating the Vascular Prostacyclin Pathways and Their Adaptation during Pregnancy and in the Newborn. *Pharmacological Reviews*. 2012 Jul 1;64(3):540–82.
52. Wise H. Multiple signalling options for prostacyclin. *Acta Pharmacol Sin*. 2003 Jul;24(7):625–30.
53. Baretella O, Vanhoutte PM. Endothelium-Dependent Contractions: Prostacyclin and Endothelin-1, Partners in Crime? *Adv Pharmacol*. 2016;77:177–208.
54. Liu B, Zhan M, Zhang Y, Li H, Wu X, Zhuang F, et al. Increased role of E prostanoid receptor-3 in prostacyclin-evoked contractile activity of spontaneously hypertensive rat mesenteric resistance arteries. *Sci Rep*. 2017 Aug 21;7(1):8927.
55. Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*. 1995 Dec 1;92(11):3337–49.
56. Campbell WB, Gauthier KM. Inducible Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor: Role of the 15-Lipoxygenase-EDHF Pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2013 Mar;61(3):176–87.
57. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jun;26(6):1215–25.
58. Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci*. 2009 Jul 16;117(4):139–55.
59. Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflugers Arch*. 2010 May;459(6):1015–23.
60. Gautier-Veyret E, Van Noolen L, Lévy P, Pepin JL, Stanke-Labesque F. Could the thromboxane A₂ pathway be a therapeutic target for the treatment of obstructive sleep apnea-induced atherosclerosis? *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015 Sep;121(Pt A):97–104.
61. Capra V, Bäck M, Barbieri SS, Camera M, Tremoli E, Rovati GE. Eicosanoids and their drugs in cardiovascular diseases: focus on atherosclerosis and stroke. *Med Res Rev*. 2013 Mar;33(2):364–438.
62. Kinsella BT, O’Mahony DJ, Fitzgerald GA. The human thromboxane A₂ receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins G_q and G₁₁ in vivo and is activated by the isoprostan 8-epi prostaglandin F₂ alpha. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 May;281(2):957–64.

63. Cracowski J-L. Les isoprostanes : un rôle physiopathologique potentiel en pathologie vasculaire. *La Revue de Médecine Interne*. 2004 Jun;25(6):459–63.
64. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, et al. Endothelin. *Pharmacological Reviews*. 2016 Mar 8;68(2):357–418.
65. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J*. 2011 Jan;25(1):16–28.
66. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Jun;8(5–6):691–728.
67. Rada B, Leto TL. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol*. 2008;15:164–87.
68. Moris D, Spartalis M, Spartalis E, Karachaliou G-S, Karaolani GI, Tsourouflis G, et al. The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Ann Transl Med*. 2017 Aug;5(16):326.
69. Bevers LM, Braam B, Post JA, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, Koomans HA, et al. Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension*. 2006 Jan;47(1):87–94.
70. Kim H, Yun J, Kwon S-M. Therapeutic Strategies for Oxidative Stress-Related Cardiovascular Diseases: Removal of Excess Reactive Oxygen Species in Adult Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2483163.
71. Whatley RE, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Lipid metabolism and signal transduction in endothelial cells. *Prog Lipid Res*. 1990;29(1):45–63.
72. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Sep 17;93(19):10417–22.
73. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Vasoconstrictor prostanoids. *Pflugers Arch*. 2010 May;459(6):941–50.
74. Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto GK, Oliveira HT, et al. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res*. 2011 Sep;44(9):920–32.
75. Yavuz BB, Yavuz B, Sener DD, Cankurtaran M, Halil M, Ulger Z, et al. Advanced age is associated with endothelial dysfunction in healthy elderly subjects. *Gerontology*. 2008;54(3):153–6.
76. Matz RL, de Sotomayor MA, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br J Pharmacol*. 2000 Sep;131(2):303–11.
77. Beyer AM, Zinkevich N, Miller B, Liu Y, Wittenburg AL, Mitchell M, et al. Transition in the mechanism of flow-mediated dilation with aging and development of coronary artery disease. *Basic Res Cardiol*. 2017 Jan;112(1):5.

78. Tang EHC, Vanhoutte PM. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics*. 2008 Feb 19;32(3):409–18.
79. Tokunaga O, Yamada T, Fan JL, Watanabe T. Age-related decline in prostacyclin synthesis by human aortic endothelial cells. Qualitative and quantitative analysis. *Am J Pathol*. 1991 Apr;138(4):941–9.
80. Nakajima M, Hashimoto M, Wang F, Yamanaga K, Nakamura N, Uchida T, et al. Aging decreases the production of PGI₂ in rat aortic endothelial cells. *Exp Gerontol*. 1997 Dec;32(6):685–93.
81. Yang Y-M, Huang A, Kaley G, Sun D. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Nov;297(5):H1829-1836.
82. Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2001 Feb;37(2 Pt 2):529–34.
83. Rodríguez-Mañas L, El-Assar M, Vallejo S, López-Dóriga P, Solís J, Petidier R, et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell*. 2009 Jun;8(3):226–38.
84. Sepúlveda C, Palomo I, Fuentes E. Mechanisms of endothelial dysfunction during aging: Predisposition to thrombosis. *Mech Ageing Dev*. 2017 Jun;164:91–9.
85. Sawabe M. Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance. *Geriatr Gerontol Int*. 2010 Jul;10 Suppl 1:S213-220.
86. Leu HJ, Vogt M, Pfrunder H, Odermatt BF. Phlebosclerosis: disorder or disease? *VASA*. 1991;20(3):230–6.
87. Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1986 Apr;8(4):344–8.
88. Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions in hypertension: when prostacyclin becomes ugly. *Hypertension*. 2011 Mar;57(3):526–31.
89. Taddei S, Bruno RM. Endothelial dysfunction in hypertension: achievements and open questions. *J Hypertens*. 2016 Aug;34(8):1492–3.
90. Pillay S, Anderson J, Couper J, Maftai O, Gent R, Peña AS. Children with Type 1 Diabetes Have Delayed Flow-Mediated Dilation. *Can J Diabetes*. 2017 Jul 25;
91. Llauradó G, Ceperuelo-Mallafré V, Vilardell C, Simó R, Albert L, Berlanga E, et al. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Metab*. 2013 Sep;39(4):355–62.
92. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000 Jul;130(5):963–74.
93. Pieper GM, Peltier BA. Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995 Mar;25(3):397–403.

94. Rösen P, Ballhausen T, Stockklauser K. Impairment of endothelium dependent relaxation in the diabetic rat heart: mechanisms and implications. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996 Jul;31 Suppl:S143-155.
95. Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1997 Aug;121(7):1383–91.
96. Shi Y, Vanhoutte PM. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes.* 2017 May;9(5):434–49.
97. Shi Y, Vanhoutte PM. Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes. *J Diabetes.* 2009 Sep;1(3):151–62.
98. Sesso HD, Buring JE, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, et al. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA.* 2008 Nov 12;300(18):2123–33.
99. Ne JYA, Cai TY, Celermajer DS, Caterson ID, Gill T, Lee CMY, et al. Obesity, arterial function and arterial structure - a systematic review and meta-analysis. *Obes Sci Pract.* 2017 Jun;3(2):171–84.
100. Van de Voorde J, Pauwels B, Boydens C, Decaluwé K. Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metab Clin Exp.* 2013 Nov;62(11):1513–21.
101. Deng G, Long Y, Yu Y-R, Li M-R. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway. *Int J Obes (Lond).* 2010 Jan;34(1):165–71.
102. de Souza Batista CM, Yang R-Z, Lee M-J, Glynn NM, Yu D-Z, Pray J, et al. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes.* 2007 Jun;56(6):1655–61.
103. Vanhoutte PM. [Endothelial dysfunction in obesity]. *Ann Pharm Fr.* 2013 Jan;71(1):42–50.
104. Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, et al. Role of Adiponectin in Preventing Vascular Stenosis: THE MISSING LINK OF ADIPO-VASCULAR AXIS. *Journal of Biological Chemistry.* 2002 Oct 4;277(40):37487–91.
105. Okamoto Y, Folco EJ, Minami M, Wara AK, Feinberg MW, Sukhova GK, et al. Adiponectin Inhibits the Production of CXC Receptor 3 Chemokine Ligands in Macrophages and Reduces T-Lymphocyte Recruitment in Atherogenesis. *Circulation Research.* 2008 Feb 1;102(2):218–25.
106. Nawrocki AR, Hofmann SM, Teupser D, Basford JE, Durand JL, Jelicks LA, et al. Lack of Association Between Adiponectin Levels and Atherosclerosis in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2010 Jun 1;30(6):1159–65.
107. Vladimirova-Kitova L, Deneva T, Angelova E, Nikolov F, Marinov B, Mateva N. Relationship of asymmetric dimethylarginine with flow-mediated dilatation in subjects with newly detected severe hypercholesterolemia. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2008 Nov;28(6):417–25.
108. Shi Y, Lüscher TF, Camici GG. Dual role of endothelial nitric oxide synthase in oxidized LDL-induced, p66Shc-mediated oxidative stress in cultured human endothelial cells. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e107787.

109. El-Sheakh AR, Ghoneim HA, Suddek GM, Ammar ESM. Attenuation of oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits by allicin. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015 Aug 14;1–9.
110. Tatematsu S, Francis SA, Natarajan P, Rader DJ, Saghatelian A, Brown JD, et al. Endothelial Lipase Is a Critical Determinant of High-Density Lipoprotein-Stimulated Sphingosine 1-Phosphate-Dependent Signaling in Vascular Endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2013 Aug 1;33(8):1788–94.
111. Hayakawa H, Raij L. Relationship between hypercholesterolaemia, endothelial dysfunction and hypertension. *J Hypertens.* 1999 May;17(5):611–9.
112. Goodwill AG, Stapleton PA, James ME, D’Auffret AC, Frisbee JC. Increased Arachidonic Acid-Induced Thromboxane Generation Impairs Skeletal Muscle Arteriolar Dilatation with Genetic Dyslipidemia. *Microcirculation.* 2008 Jan;15(7):621–31.
113. De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res.* 1982 Oct;51(4):439–47.
114. Nagao T, Vanhoutte PM. Hyperpolarization contributes to endothelium-dependent relaxations to acetylcholine in femoral veins of rats. *Am J Physiol.* 1991 Oct;261(4 Pt 2):H1034-1037.
115. Miller VM, Komori K, Burnett JC, Vanhoutte PM. Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and veins. *Am J Physiol.* 1989 Oct;257(4 Pt 2):H1127-1131.
116. Herkert O, Kuhl H, Busse R, Schini-Kerth VB. The progestin levonorgestrel induces endothelium-independent relaxation of rabbit jugular vein *via* inhibition of calcium entry and protein kinase C: role of cyclic AMP. *British Journal of Pharmacology.* 2000 Aug;130(8):1911–8.
117. Kilian JG, Thanyasiri P, Celermajer DS, Adams MR. Saphenous vein grafts display poor endothelium-dependent and endothelium-independent dilation--implications for the pathogenesis of vein graft atherosclerosis. *Heart Lung Circ.* 2008 Apr;17(2):96–9.
118. Thulesius O, Said S, Shuhaiber H, Neglen P, Gjores JE. Endothelial mediated enhancement of noradrenaline induced vasoconstriction in normal and varicose veins. *Clin Physiol.* 1991 Mar;11(2):153–9.
119. Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol.* 2009 Mar 15;77(6):937–46.
120. Hall WL. Dietary saturated and unsaturated fats as determinants of blood pressure and vascular function. *Nutr Res Rev.* 2009 Jun;22(1):18–38.
121. Haeggström JZ, Funk CD. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev.* 2011 Oct 12;111(10):5866–98.
122. Mori TA. Marine OMEGA-3 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. *Fitoterapia.* 2017 Sep 27;
123. Calder PC. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc.* 2002 Aug;61(3):345–58.

124. Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med*. 2015 Dec;24(6):931–41.
125. Weylandt KH, Chiu C-Y, Gomolka B, Waechter SF, Wiedenmann B. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: Towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2012 Mar;97(3–4):73–82.
126. Nagai T, Honda Y, Sugano Y, Nishimura K, Nakai M, Honda S, et al. Circulating Omega-6, But Not Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Are Associated with Clinical Outcomes in Patients with Acute Decompensated Heart Failure. *PLoS ONE*. 2016;11(11):e0165841.
127. Umemoto N, Ishii H, Kamoi D, Aoyama T, Sakakibara T, Takahashi H, et al. Reverse association of omega-3/omega-6 polyunsaturated fatty acids ratios with carotid atherosclerosis in patients on hemodialysis. *Atherosclerosis*. 2016 Jun;249:65–9.
128. Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, Summerbell CD, Moore H, Worthington HV, et al. Omega 3 fatty acids for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004 Oct 18;(4):CD003177.
129. Campbell A, Price J, Hiatt WR. Omega-3 fatty acids for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Jul 4;(7):CD003833.
130. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med*. 1992 Jan 30;326(5):310–8.
131. Poredoš P. Interrelationship between venous and arterial thrombosis. *Int Angiol*. 2017 Aug;36(4):295–8.
132. Kearon C, Ageno W, Cannegieter SC, Cosmi B, Geersing G-J, Kyrle PA, et al. Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: guidance from the SSC of ISTH. *J Thromb Haemost*. 2016 Jul;14(7):1480–3.
133. Di Nisio M, van Es N, Büller HR. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *The Lancet*. 2016 Dec;388(10063):3060–73.
134. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, Blaivas A, Jimenez D, Bounameaux H, et al. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*. 2016 Feb;149(2):315–52.
135. Kearon C, Akl EA. Duration of anticoagulant therapy for deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Blood*. 2014 Mar 20;123(12):1794–801.
136. Goldhaber SZ, Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, et al. A prospective study of risk factors for pulmonary embolism in women. *JAMA*. 1997 Feb 26;277(8):642–5.
137. Becattini C, Agnelli G, Prandoni P, Silingardi M, Salvi R, Taliani MR, et al. A prospective study on cardiovascular events after acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 2005 Jan;26(1):77–83.
138. Agnelli G, Becattini C. Venous thromboembolism and atherosclerosis: common denominators or different diseases? *J Thromb Haemost*. 2006 Sep;4(9):1886–90.
139. Stein PD, Beemath A, Olson RE. Obesity as a risk factor in venous thromboembolism. *Am J Med*. 2005 Sep;118(9):978–80.

140. Petrauskiene V, Falk M, Waernbaum I, Norberg M, Eriksson JW. The risk of venous thromboembolism is markedly elevated in patients with diabetes. *Diabetologia*. 2005 May;48(5):1017–21.
141. Hong C, Zhu F, Du D, Pilgram TK, Sicard GA, Bae KT. Coronary artery calcification and risk factors for atherosclerosis in patients with venous thromboembolism. *Atherosclerosis*. 2005 Nov;183(1):169–74.
142. Vormittag R, Vukovich T, Stain M, Lehr S, Minar E, Pabinger I. Lipoprotein (a) in patients with spontaneous venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2007;120(1):15–20.
143. Vayá A, Mira Y, Ferrando F, Contreras M, Estelles A, España F, et al. Hyperlipidaemia and venous thromboembolism in patients lacking thrombophilic risk factors. *Br J Haematol*. 2002 Jul;118(1):255–9.
144. Deguchi H, Pecheniuk NM, Elias DJ, Averell PM, Griffin JH. High-density lipoprotein deficiency and dyslipoproteinemia associated with venous thrombosis in men. *Circulation*. 2005 Aug 9;112(6):893–9.
145. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Polak JF, Folsom AR. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Arch Intern Med*. 2002 May 27;162(10):1182–9.
146. Glynn RJ, Rosner B. Comparison of risk factors for the competing risks of coronary heart disease, stroke, and venous thromboembolism. *Am J Epidemiol*. 2005 Nov 15;162(10):975–82.
147. van der Hagen PB, Folsom AR, Jenny NS, Heckbert SR, O'Meara ES, Reich LM, et al. Subclinical atherosclerosis and the risk of future venous thrombosis in the Cardiovascular Health Study. *J Thromb Haemost*. 2006 Sep;4(9):1903–8.
148. Gaertner S, Cordeanu E-M, Nouri S, Faller A-M, Frantz A-S, Mirea C, et al. Rivaroxaban versus standard anticoagulation for symptomatic venous thromboembolism (REMOTEV observational study): Analysis of 6-month outcomes. *Int J Cardiol*. 2017 Jan 1;226:103–9.
149. Ay C, Tengler T, Vormittag R, Simanek R, Dorda W, Vukovich T, et al. Venous thromboembolism--a manifestation of the metabolic syndrome. *Haematologica*. 2007 Mar;92(3):374–80.
150. Ambrosetti M, Ageno W, Salerno M, Pedretti RFE, Salerno-Uriarte JA. Metabolic syndrome as a risk factor for deep vein thrombosis after acute cardiac conditions. *Thromb Res*. 2007;120(6):815–8.
151. Xu X, Wang B, Ren C, Hu J, Greenberg DA, Chen T, et al. Age-related Impairment of Vascular Structure and Functions. *Aging Dis*. 2017 Oct;8(5):590–610.
152. Yildiz O. Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Apr;1100:353–60.
153. Shi Y, Man RYK, Vanhoutte PM. Two isoforms of cyclooxygenase contribute to augmented endothelium-dependent contractions in femoral arteries of 1-year-old rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2008 Feb;29(2):185–92.

154. Graham DA, Rush JWE. Cyclooxygenase and thromboxane/prostaglandin receptor contribute to aortic endothelium-dependent dysfunction in aging female spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol*. 2009 Oct;107(4):1059–67.
155. Alvarez de Sotomayor M, Mingorance C, Andriantsitohaina R. Fenofibrate improves age-related endothelial dysfunction in rat resistance arteries. *Atherosclerosis*. 2007 Jul;193(1):112–20.
156. Nakahata N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther*. 2008 Apr;118(1):18–35.
157. Tarantino E, Amadio P, Squellerio I, Porro B, Sandrini L, Turnu L, et al. Role of thromboxane-dependent platelet activation in venous thrombosis: Aspirin effects in mouse model. *Pharmacol Res*. 2016;107:415–25.
158. Viridis A, Bacca A, Colucci R, Duranti E, Fornai M, Materazzi G, et al. Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. *Hypertension*. 2013 Aug;62(2):337–44.
159. Feng J, Anderson K, Singh AK, Ehsan A, Mitchell H, Liu Y, et al. Diabetes Upregulation of Cyclooxygenase 2 Contributes to Altered Coronary Reactivity After Cardiac Surgery. *Ann Thorac Surg*. 2017 Aug;104(2):568–76.
160. Delannoy E, Courtois A, Freund-Michel V, Leblais V, Marthan R, Muller B. Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors. *Cardiovasc Res*. 2010 Feb 1;85(3):582–92.
161. DeWitt DL, Day JS, Sonnenburg WK, Smith WL. Concentrations of prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin I2 synthase in the endothelium and smooth muscle of bovine aorta. *J Clin Invest*. 1983 Dec;72(6):1882–8.
162. Guevara-Balcazar G, Ramirez-Sanchez I, Mera-Jimenez E, Rubio-Gayosso I, Aguilar-Najera ME, Castillo-Hernandez MC. Participation of COX-1 and COX-2 in the contractile effect of phenylephrine in prepubescent and old rats. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. 2017;21(4):407.
163. Shi Z, Chen Y, Pei Y, Long Y, Liu C, Cao J, et al. The role of cyclooxygenase-2 in the protection against apoptosis in vascular endothelial cells induced by cigarette smoking. *J Thorac Dis*. 2017 Jan;9(1):30–41.
164. De Vecchis R, Baldi C, Di Biase G, Ariano C, Cioppa C, Giasi A, et al. Cardiovascular risk associated with celecoxib or etoricoxib: a meta-analysis of randomized controlled trials which adopted comparison with placebo or naproxen. *Minerva Cardioangiol*. 2014 Dec;62(6):437–48.
165. Klotz TA, Cohn LS, Zipser RD. Urinary excretion of thromboxane B2 in patients with venous thromboembolic disease. *Chest*. 1984 Mar;85(3):329–35.
166. Libby P. Multiple mechanisms of thrombosis complicating atherosclerotic plaques. *Clin Cardiol*. 2000 Nov;23 Suppl 6:VI-3-7.
167. Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol*. 2000 Oct 19;86(8B):3J–8J; discussion 8J–9J.

168. Sueishi K, Ichikawa K, Kato K, Nakagawa K, Chen YX. Atherosclerosis: coagulation and fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost.* 1998;24(3):255–60.
169. Holvoet P, Collen D. Thrombosis and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1997 Oct;8(5):320–8.
170. Prandoni P. Venous thromboembolism and atherosclerosis: is there a link? *J Thromb Haemost.* 2007 Jul;5 Suppl 1:270–5.
171. Groeger AL, Cipollina C, Cole MP, Woodcock SR, Bonacci G, Rudolph TK, et al. Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nature Chemical Biology.* 2010 Jun;6(6):433–41.
172. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53:409–35.
173. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart J-C, Glineur C, et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 May 1;22(5):717–26.
174. Rieusset J, Touri F, Michalik L, Escher P, Desvergne B, Niesor E, et al. A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol.* 2002 Nov;16(11):2628–44.
175. Reiner MF, Stivala S, Limacher A, Bonetti NR, Méan M, Egloff M, et al. Omega-3 fatty acids predict recurrent venous thromboembolism or total mortality in elderly patients with acute venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2017 Jan;15(1):47–56.

**Impact des facteurs de risque cardio-vasculaire
majeurs d'athérosclérose et du vieillissement sur la
fonction endothéliale des vaisseaux fémoraux dans le
risque de thrombose veineuse**

Résumé

L'identification des facteurs de risque de la maladie thromboembolique veineuse (MVTE) est un enjeu pour la prévention de la maladie et de sa récurrence. Nous avons montré chez l'homme que le cumul des facteurs de risque cardiovasculaires d'athérosclérose (FRCV) est associé à la MVTE non provoquée, à sa gravité et au risque de récurrence. Le vieillissement, FRCV et facteur de risque de MVTE, induit chez le rat une dysfonction endothéliale de la veine fémorale liée aux cyclooxygénases (COX), associée à la génération de prostanoïdes au profil pro-thrombogène. Chez le rat obèse ZSF1 jeune, le cumul des FRCV induit une dysfonction endothéliale veineuse précoce liée aux COX-1 et 2. Un traitement par Ω -3 chez le rat vieillissant permet de moduler le métabolisme de l'acide arachidonique pour générer des prostanoïdes moins délétères COX-2-dépendants pouvant réduire le risque thrombogène, faisant des Ω -3 un traitement adjuvant potentiel de la MVTE.

Mots clefs : maladie veineuse thrombo-embolique, facteurs de risque cardio-vasculaires, vieillissement, dysfonction endothéliale, cyclooxygénases, oméga-3.

Summary

Identification of risk factors for venous thromboembolism (VTE) is a major concern for the prevention of the disease and its recurrence. We have shown in humans that the cumulative cardiovascular risk factors (CVRF) for atherosclerosis were associated with unprovoked VTE, its severity and the risk of recurrence. Aging, CVRF and VTE risk factor, induced an endothelial dysfunction in the rat femoral vein involving cyclooxygenases (COX) associated with potential pro-thrombogenic prostanoids generation. In the young obese ZSF1 rat, cumulative CVRF induced early venous endothelial dysfunction related to COX-1 and 2. Omega-3 treatment in aging rats modulates arachidonic acid pathway leading to COX-2-mediated formation of less deleterious prostanoids, associated with a decreased thrombogenic risk, making omega-3 a potential adjuvant treatment for VTE.

Keywords: venous thromboembolism, cardiovascular risk factors, aging, endothelial dysfunction, cyclooxygenase, omega-3