

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UFR DE BIOLOGIE

ANNEE 1998

N° attribué par la bibliothèque :

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée et soutenue publiquement

par

Delphine CORSEaux

le 27 avril 1998

**EVALUATION DE L'EXPRESSION DU FACTEUR TISSULAIRE
EN PATHOLOGIE VASCULAIRE EXPERIMENTALE**

Directeur de thèse : Madame le Docteur Brigitte Jude

JURY

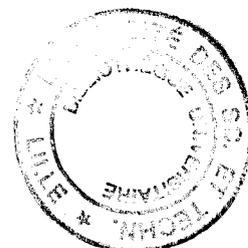
Rapporteurs : Monsieur Jean-Marie Freyssinet

Monsieur Jean-Marc Herbert

Examineurs : Monsieur le Professeur Michel Bertrand

Monsieur le Professeur Benoni Boilly

Monsieur le Professeur Bernard Dupuis



A mes parents, pour leur amour et leur soutien tout au long de mes études,

A Jamusz, pour sa patience, sa compréhension et son soutien au quotidien,

A ma famille,

A mes amis, d'ici et d'ailleurs

Aux Membres de ce jury

A Madame le Docteur **Brigitte Jude**

C'est avec beaucoup de gentillesse que vous m'avez accueillie en acceptant de diriger mes travaux de recherches. Vos précieux conseils et votre optimisme m'ont permis de présenter cette thèse. Soyez assurée de l'expression de ma profonde reconnaissance et de toute ma sympathie.

A Monsieur **Jean-Marie Freyssinet**

Vous m'avez fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse, et je tenais à vous en remercier. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de ma profonde estime.

A Monsieur **Jean-Marc Herbert**

C'est sous votre direction que j'ai débuté dans le domaine de la recherche. A votre contact, j'ai appris nombre de choses. Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, malgré le peu de temps disponible dont vous disposez. Soyez assuré de ma profonde estime et de toute ma sympathie.

A Monsieur le Professeur **Michel Bertrand**

Malgré un emploi du temps chargé, vous avez accepté de juger ce travail. Je suis particulièrement sensible à cet honneur et vous en remercie. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur **Benoni Boilly**

Je vous ai demandé de participer à ce jury de thèse, vous avez accepté sans hésitation, et je tenais à vous en remercier. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de ma profonde estime.

A Monsieur le Professeur **Bernard Dupuis**

Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire où vous m'avez permis de réaliser ce travail. Vous m'avez fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance et de mon profond respect.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du département d'Hématologie A (Hôpital Cardiologique), au sein du Laboratoire de Culture Cellulaire (Faculté de Médecine) et du Laboratoire de Pharmacologie (Faculté de Médecine), CH et U de Lille. Il a été soutenu financièrement par la Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales, le Centre Hospitalier et Universitaire de Lille et le Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais.

Je tiens également à remercier :

Monsieur le Professeur **Alain Cosson** de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire d'Hématologie A du CH et U de Lille.

Monsieur le Professeur **Christophe Bauters**, Monsieur le Docteur **Eugène McFadden**, Monsieur le Docteur **Benoît Vallet** et Monsieur le Docteur **Eric Van Velle** pour leur aide à la réalisation de ce travail.

Marie Pascale Lenglet-Desmoitier, **Hélène Lepetz** et **Véronique Rose** du Laboratoire de Culture Cellulaire pour leur gentillesse, leur bonne humeur, leur soutien et toute l'aide qu'elles ont pu m'apporter.

L'ensemble du personnel du Laboratoire d'Hématologie A pour son accueil, sa disponibilité et sa bonne humeur et plus particulièrement **Michelle Bève**, **Jean Claude Havez**, **Dominique Pruvot**, **Bertrand Vaast** et **Florence Welele** pour leur précieuse collaboration.

L'ensemble du personnel du Laboratoire de Pharmacologie pour leur accueil et leur gentillesse pendant ces trois années.

Le Laboratoire de Biochimie du **Professeur Formstecher** et le Laboratoire d'Anatomo Cytologie Pathologique du **Professeur Gosselin** du CH et U de Lille pour leur collaboration à la réalisation de ce travail.

Mes sincères remerciements à mes collègues du Laboratoire, en particulier **Emmanuelle Jeanpierre** pour sa bonne humeur et son enthousiasme, **Nathalie Trillot** pour sa gentillesse et ses encouragements et **Christophe Zawadzki** pour sa sympathie et sa rigueur dans le travail.

Je remercie également mes amies et collègues **Lucia Rugeri** pour son enthousiasme, son soutien et son aide tout au long de ces années ; **Isabelle Six** pour son extrême gentillesse, son enthousiasme mais aussi pour ses précieux conseils, son aide et sa disponibilité.

Je remercie **Christophe Decoene** et **Gilles Lebuffe** pour leur sympathie et leur aide apportée à la réalisation de ce travail.

Je remercie également **Jérôme Leclerc** pour sa bonne humeur et son énergie dans le travail.

Mes sincères remerciements à **Thibaud Meurice** pour sa gentillesse, ses compétences et pour m'avoir appris les gestes de cathétérisme essentiels à la réalisation de ce travail.

Je remercie sincèrement **Thierry Le Tourneau** pour son dynamisme, sa bonne humeur, sa rigueur et son savoir-faire.

ABREVIATIONS

AA	acides aminés
ABP 280	actin binding protein 280
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	adénylate monophosphate cyclique
AP-1	activation protein-1
APAAP	alcaline phosphatase anti-alcaline phosphatase
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATIII	antithrombine III
bFGF	basic fibroblast growth factor
CHOL	cholestérol
CIVD	coagulation intravasculaire disséminée
CMLs	cellules musculaires lisses
DAB	diaminobenzidine tétrachloride
DAG	diacyl glycérol
DEGR-Xa	active-site-inhibited Xa
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
Egr-1	early growth response gene 1
EPR-1	effector cell protease receptor-1
ESM	ecart standard à la moyenne
FAK	focal adhesion kinase
FGF	fibroblast growth factor
FTs	facteur tissulaire soluble
HDL	high density lipoproteins
HEPES	acide hydroxyéthyl pipérazine éthane sulfonique
ICAM-1	inter cellular adhesion molecule
IDL	intermediate density lipoproteins
IL-1 β	interleukine 1 β
IP3	inositol triphosphate
kDa	kilodalton
L-arg	L-arginine

LBP	lipopolysaccharide binding protein
LDL	low density lipoproteins
LRE	lipopolysaccharide responsive element
MAP-kinase	mitogen activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MGG	May Grünwald Giemsa
MSL	milieu de séparation des lymphocytes
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NO	monoxyde d'azote
NOG	N octyl β D glucopyranoside
PBS	phosphate buffer saline
PDGF	platelet derived growth factor
PE	phosphatidyléthanolamine
PF4	platelet factor 4
PFA	paraformaldéhyde
PMA	phorbol myristate acetate
PPSB	proconvertine, proaccéléline, facteur Stuart, facteur antihémophilique B
PS	phosphatidylsérine
SRR	serum responsive region
TBS	tris buffer saline
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TG	triglycerides
TGF β	transforming growth factor β
TNF α	tumor necrosis factor α
TP	taux de prothrombine
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	very low density lipoproteins
VPF	vascular permeability factor
WKS	Tryptophane-Lysine-Sérine
Δ DO	variation de densité optique

SOMMAIRE

1^{ère} PARTIE : Revue de la bibliographie sur le facteur tissulaire et son rôle en pathologie vasculaire

	Page
I GENERALITES SUR LE FACTEUR TISSULAIRE (FT)	2
I-1 Structure	2
I-2 Expression cellulaire	8
I-2-1 EXPRESSION INDUCTIBLE DU FT	12
I-2-1-1 Les monocytes	12
I-2-1-2 Les cellules endothéliales	13
I-2-1-3 Interaction monocytes-cellules endothéliales	14
I-2-1-4 Les cellules musculaires lisses (CMLs)	15
I-2-2 IMPORTANCE DU FT COMME RECEPTEUR DANS LES AUTRES TYPES CELLULAIRES	17
I-3 Mécanisme d'action	19
I-4 Régulation de l'activité catalytique FT-FVIIa	21
I-4-1 LE TFPI	21
I-4-2 L'ATIII	22
I-5 Schéma de la coagulation	23
I-6 Régulation de l'expression du FT	25
I-6-1 SYSTEMES TRANSDUCTIONNELS ET SECONDS MESSAGERS	25
I-6-2 REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE DU FT	29
I-7 Autres voies d'activation de la coagulation sur la membrane monocytaire	33
II ROLE DU FACTEUR TISSULAIRE EN PATHOLOGIE VASCULAIRE	34
II-1 Pathologie vasculaire artérielle	34
II-1-1 FT ET PLAQUES D'ATHEROSCLEROSE	35
II-1-2 FT ET MONOCYTES CIRCULANTS	37
II-1-3 FT, ANGIOPLASTIE ET RESTENOSE	37
II-1-4 FT ET APOPTOSE	39
II-1-5 FACTEURS RESPONSABLES DE LA PRESENCE DU FT DANS LES PLAQUES ATHEROSCLEREUSES	40
II-2 Coagulation Intravasculaire Disséminée (CIVD)	42
II-3 Modulation pharmacologique de l'expression du FT	44

III IMPLICATION DU FT DANS D'AUTRES PATHOLOGIES	45
III-1 Pathologie cancéreuse	45
III-2 Autres pathologies	46
<u>2^{ème} PARTIE : Matériels et méthodes</u>	48
I INTRODUCTION	49
I-1 La L-arginine	49
I-2 Le basic Fibroblast growth factor (bFGF)	50
II TECHNIQUES D'ANALYSE	51
II-1 Prélèvements sanguins	52
II-2 Isolement des cellules mononucléées	52
II-3 Préparation des étalements cellulaires	53
II-4 Méthodes fonctionnelles du dosage du FT	54
II-4-1 TECHNIQUES DE LYSE CELLULAIRE	54
II-4-2 METHODE AMIDOLYTIQUE	55
II-4-2-1 Principe	55
II-4-2-2 Choix des facteurs VII et X	55
II-4-2-3 Procédure	56
II-4-3 TEST DE NEUTRALISATION PAR UN ANTICORPS ANTI-FT	57
II-5 Méthodes immunologiques de détection du FT	58
II-5-1 IMMUNOCYTOCHIMIE PAR TECHNIQUE APAAP	58
II-5-1-1 Réactifs	59
II-5-1-2 Procédure	59
II-5-1-3 Lecture des lames	60
II-5-2 IMMUNOCYTOCHIMIE PAR TECHNIQUE ABC PEROXYDASE	60
II-5-2-1 Principe	60
II-5-2-2 Procédure	61
II-6 Contrôles de stérilité et d'apyrogénicité	62
II-6-1 CONTROLES DE STERILITE	62
II-6-2 CONTROLES D'APYROGENICITE	62
II-7 Dosage des facteurs plasmatiques	62

II-7-1 DOSAGE DU TAUX DE PROTHROMBINE	63
II-7-2 DOSAGE DES FACTEURS II, V ET VII+X	63
II-7-3 DOSAGE DU FIBRINOGENE	64
II-8 Etudes histologiques	64
III MODELE EXPERIMENTAL	65
III-1 Lésion unilatérale sans régime	65
III-1-1 PROCEDURE	65
III-1-2 EVALUATION MACROSCOPIQUE DE LA REENDOTHELIALISATION PAR TECHNIQUE DU BLEU EVANS	66
III-2 Lésion bilatérale sans régime	66
III-3 Induction par régime enrichi en cholestérol	66
III-3-1 PROCEDURE	66
III-3-2 DOSAGE DES LIPIDES TOTAUX	67
III-4 Lésion bilatérale et régime enrichi en cholestérol	67
III-4-1 PROCEDURE	67
III-4-2 ARTERIOGRAPHIE	67
III-5 Effet de l'angioplastie	69
III-5-1 PROCEDURE	69
III-5-2 ANGIOPLASTIE ILIAQUE	69
III-6 Modulation pharmacologique	69
III-6-1 EFFET DE LA L-ARGININE	69
III-6-1-1 Procédure	69
III-6-1-2 Dosage de la L-arginine	70
III-6-2 EFFET DU BFGF	70
III-7 Effet de l'endotoxine	72
IV ANALYSE STATISTIQUE	72

3^{ème} PARTIE : Résultats et discussions	73
I LAPINS TEMOINS	74
I-1 Résultats	74
I-1-1 Paramètres cytologiques	74
I-1-2 Formule leucocytaire	74
I-1-3 Tests de coagulation plasmatiques	75
I-1-4 FT : Résultats fonctionnels	75
I-1-5 FT : Résultats immunologiques	75
I-1-5-1 IMMUNOCYTOCHIMIE	75
I-1-5-2 IMMUNOHISTOCHEMIE	76
I-2 Discussion	76
II LESION UNILATERALE ET BILATERALE	79
II-1 Résultats	79
II-2 Discussion	86
III LESION BILATERALE ASSOCIEE A UNE HYPERCHOLESTEROLEMIE	87
III-1 Résultats	87
III-2 Discussion	90
IV EFFET DE L'ANGIOPLASTIE	91
IV-1 Résultats	91
IV-2 Discussion	92
V MODULATION DE L'EXPRESSION DU FT	94
V-1 Effet de la L-arginine	94
V-1-1 RESULTATS	94
V-1-2 DISCUSSION	96
V-2 Effet du bFGF	97
V-2-1 RESULTATS	97
V-2-2 DISCUSSION	105
V-3 Effet de l'endotoxine	108
V-3-1 RESULTATS	108
V-3-2 DISCUSSION	117
CONCLUSION	121
BIBLIOGRAPHIE	123

1^{ère} PARTIE :

**Revue de la bibliographie sur le facteur tissulaire et
son rôle en pathologie vasculaire**

Chez les vertébrés, le sang est maintenu dans un état de fluidité dans les vaisseaux afin de permettre les échanges de métabolites dans l'organisme. Le délicat équilibre du système de l'hémostase assure en permanence la limitation des pertes sanguines lors de la rupture de la continuité vasculaire. L'hémostase est obtenue par activation des plaquettes et génération de fibrine après une cascade d'activations de type enzymatique aboutissant à la formation d'un caillot sanguin.

L'enchaînement réactionnel implique un grand nombre de facteurs de nature protéique présents pour la plupart à l'état de proenzymes et qui sont transformés après protéolyse limitée en enzymes actifs. Ces événements se déroulent à la surface de membranes cellulaires. Seul un certain nombre de récepteurs de surface est capable de modifier l'environnement extracellulaire.

Parmi ces récepteurs, le facteur tissulaire est actuellement considéré comme l'initiateur essentiel de la coagulation plasmatique in vivo.

I GENERALITES SUR LE FACTEUR TISSULAIRE (FT)

Le FT est une glycoprotéine transmembranaire qui fonctionne comme un récepteur cellulaire de haute affinité pour les facteurs VII (FVII) et VII activé (FVIIa) de la coagulation, et comme cofacteur du FVIIa. Le FT est considéré comme l'initiateur principal de la coagulation in vivo depuis moins de 10 ans (1). Cette reconnaissance relativement tardive est probablement liée au fait que l'étude de sa structure et de son mécanisme d'action est récente et repose sur la purification de l'apoprotéine (2-3) et le clonage du gène (4-7).

I-1 Structure

Le gène du FT, situé sur le chromosome 1 en position 1p21-22 (8), est constitué de 12400 paires de bases et comprend 6 exons séparés par 5 introns (9). Un propeptide de 295 acides

aminés (AA) est produit à partir du gène. Après clivage d'un peptide signal de 32 AA, la protéine mature apparaît (5).

Le FT humain, comparé aux autres facteurs de la coagulation, est relativement petit. C'est une glycoprotéine transmembranaire de 263 AA. Cette protéine de 47 kDa comporte 3 domaines (**Figure 1**) :

- ◆ un court domaine intracytoplasmique de 21 AA situé en position C terminale de la protéine. Ce domaine comporte une unique cystéine liée par une liaison thioester à un acide gras (palmitate ou stéarate) qui permet vraisemblablement d'ancrer la molécule à la face interne de la membrane cellulaire. Le résidu Sérine 258 peut être phosphorylé par un mécanisme dépendant de la protéine kinase C (10). Cette phosphorylation pourrait moduler indirectement l'activité du FT en modifiant son internalisation, sa dégradation ou sa localisation intracellulaire.

- ◆ un domaine transmembranaire qui comporte 23 AA hydrophobes.

- ◆ un domaine extracellulaire, supportant la fonction de récepteur, qui comporte 219 AA. Dans ce domaine 2 ponts disulfure unissent 2 paires de cystéines conférant à la molécule 2 boucles stables. Seule la boucle formée par les cystéines 186 et 209 est nécessaire pour l'activité FT (11). La seconde boucle est donc probablement indispensable à la stabilisation du domaine extracellulaire. Ce domaine possède également 3 sites de N-glycosylation dont le rôle demeure incertain : ils permettraient la bonne orientation membranaire de la molécule (12) et/ou diminueraient sa susceptibilité à la protéolyse durant le transport intracytoplasmique.

Le domaine extracellulaire présente des similarités conformationnelles avec les récepteurs cellulaires des cytokines et des facteurs de croissance hématopoïétiques (13). L'ensemble des données structurales permet de rattacher le FT à la famille des récepteurs de cytokines de classe 2 qui inclut également les récepteurs de l'interféron α , de l'interféron γ et

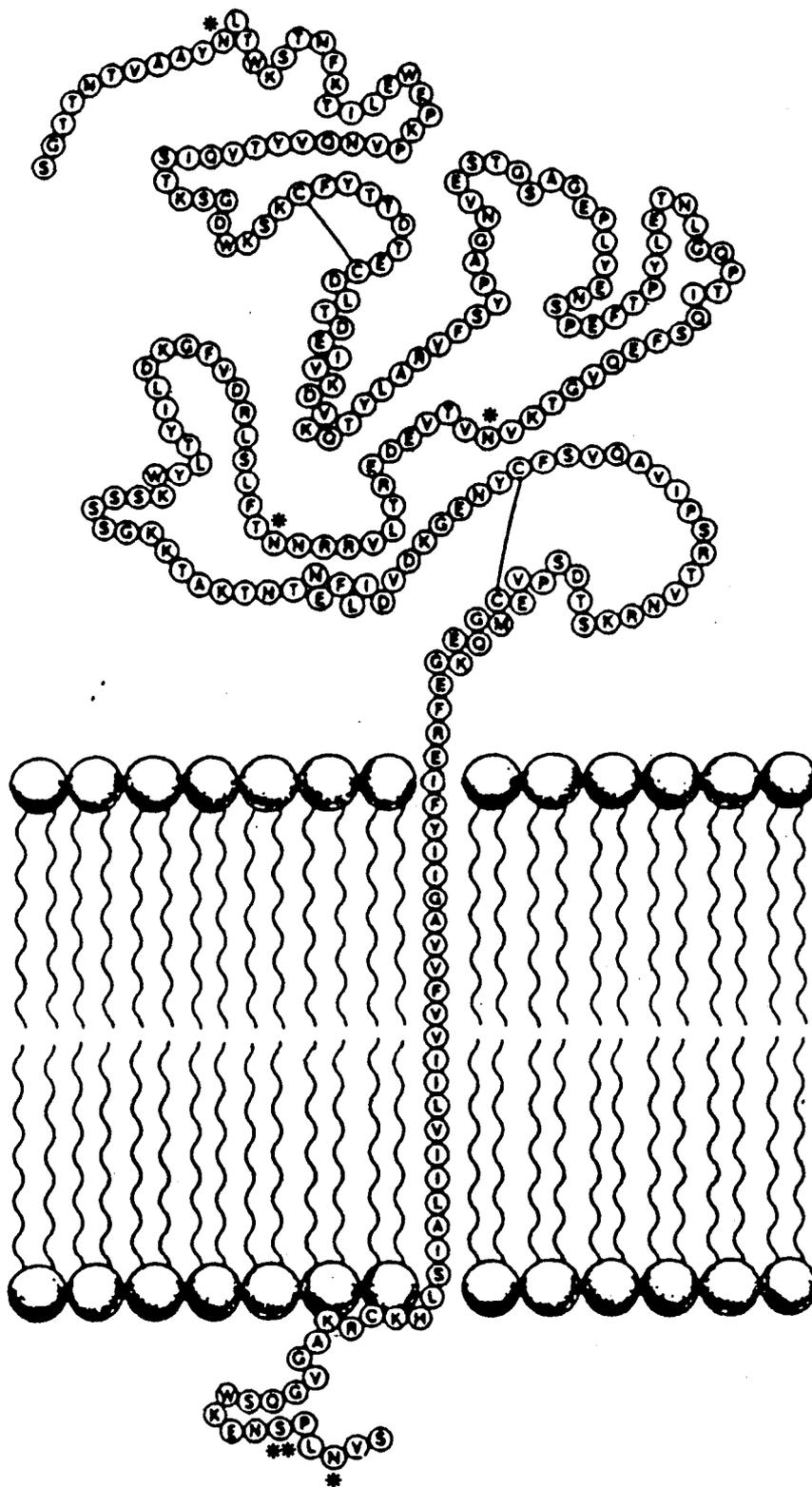


Figure 1 : Modélisation du Facteur Tissulaire humain d'après O'Brien et al. (1)

*Sites de N glycosylation

**Serine phosphorylable

de l'interleukine 10. La cristallisation du domaine extracellulaire a récemment été réalisée par plusieurs équipes permettant d'établir sa structure tridimensionnelle (14-15) (**Figures 2a et 2b**). Il est caractérisé par la présence de 2 modules disposés en feuillets plissés β qui forment un angle de 125° et délimitent une région intermodule extensible où se situe le site de liaison du FVII. Ces modules comportent de nombreuses similarités par rapport au module de type III de la fibronectine. Cette structure en feuillet β est similaire à celle du groupe C2 de la superfamille des immunoglobulines (16).

Les expériences de mutagenèse dirigée réalisées sur le domaine extracellulaire du FT ont permis de préciser les résidus importants pour la fixation du FVII au FT d'une part, et pour la fonction coagulante c'est à dire l'activation du facteur X (FX) d'autre part (**Figures 3a et 3b**) (17-18).

Les résidus les plus importants pour la fixation du FVIIa sont situés sur le module 1 (Lys20-Ile22-Glu24-Glu26-Tryp45-Asp58) et une boucle du module 2 appelée BC Finger Loop (Tyr94-Phe40).

Les mutations réalisées au sein de la zone d'interface des 2 modules confirment que ce domaine est impliqué dans la conformation de la molécule FT et donc confirment l'importance de l'interface pour l'activité du FT (18).

Les Lys165 et Lys166 sont indispensables à l'activité enzymatique complète du FT (activation des facteurs IX (FIX) et FX). Ces résidus sont positionnés près de la membrane phospholipidique du module 2 et constituent un site de fixation pour les substrats moléculaires tels que le FX (19). Leur mutation permet de confirmer leur implication dans l'orientation correcte du substrat avant la protéolyse. Ils n'interviennent donc pas sur la fixation du FVIIa au FT.

La séquence W158KS est, quant à elle, associée au site fonctionnel.

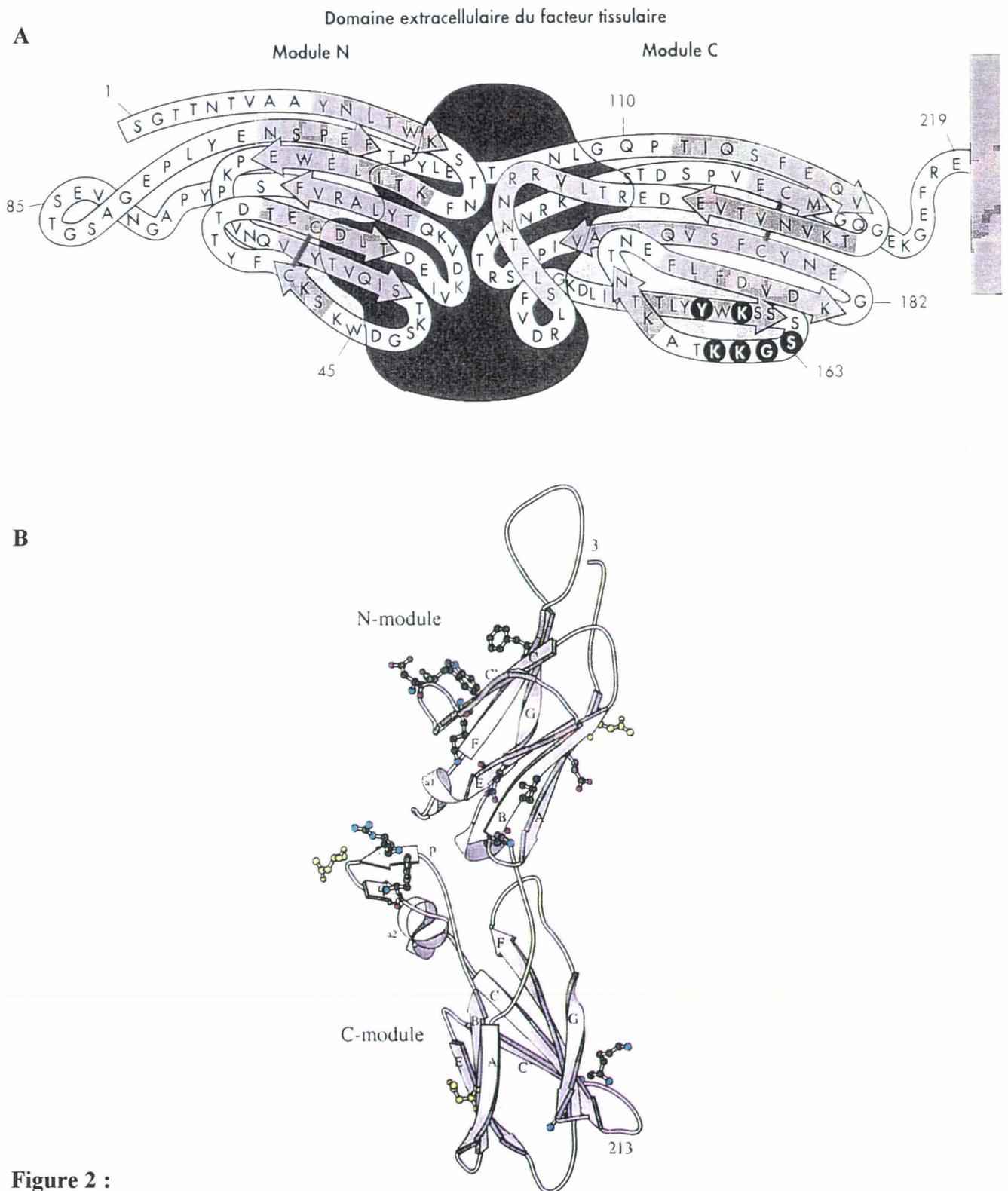


Figure 2 :

A : Schéma du domaine extracellulaire du Facteur Tissulaire d'après Ruf et al. (10).

En sombre, zone proposée de fixation du FVIIa ; les résidus cerclés de noir sont les résidus importants pour l'interaction avec les substrats macromoléculaires.

B : Structure tridimensionnelle du domaine extracellulaire du Facteur Tissulaire d'après Martin et al. (16). En jaune, les sites de N-glycosylation.

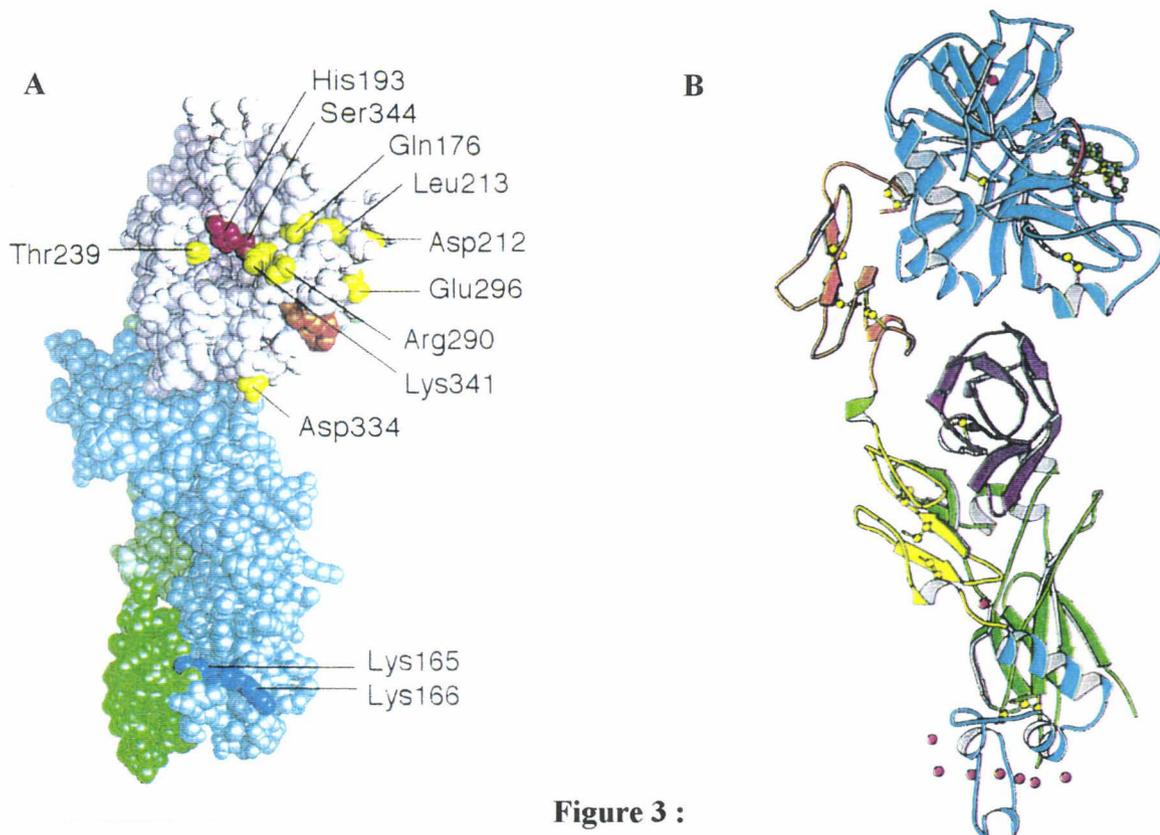


Figure 3 :

A : Modélisation du complexe FT•FVIIa d'après Edgington et al. (119).

Le FT est représenté en bleu, les domaines Gla et EGF du FVIIa en vert, et le domaine protéase du FVIIa en orange. Les résidus essentiels à l'activité enzymatique sont représentés en jaune pour le FVIIa et en bleu foncé pour le FT.

B : Diagramme en ruban du complexe FT:FVIIa d'après Banner et al. (20).

Le FT est représenté en couleur claire, le FVIIa en couleur foncée. En haut se situent les domaines EGF et le domaine catalytique du FVIIa. En bas se situe le domaine Gla du FVIIa. Les boules rouges représentent les ions Ca^{2+} .

Le domaine extracellulaire, qui a été purifié, est soluble (FTs) et garde la capacité de lier le FVII et le FVIIa. La cristallisation récente de ce complexe a confirmé l'importance de l'ensemble de ces résidus. Elle a montré que le FTs conservait au sein du complexe FT-VIIa pratiquement la même structure que le FT libre et imposait à la molécule de FVIIa, initialement flexible, une conformation bien précise en la fixant en trois points principaux :

la région C terminale du FT fixe le domaine Gla du FVIIa,

la région centrale fixe le domaine EGF-1 et

la région N terminale fixe le domaine EGF-2 et le domaine catalytique du FVIIa (20).

Mais ce type de complexe (FTs-FVIIa) possède une activité enzymatique limitée, seuls les complexes FT-FVIIa permettent une activation du FX. Cette particularité a été utilisée pour doser le FVIIa (21-22).

L'analyse de l'ADN complémentaire (ADNc) du FT chez le lapin montre une très forte homologie avec le FT humain (**Figure 4**). La protéine native du FT de lapin est estimée entre 45 et 48 kDa. La protéine mature est également constituée de 263 AA. On retrouve dans le FT du lapin 3 domaines spécifiques composés des zones essentielles du FT humain tels que les ponts disulfures ou les sites de N-glycosylation (23-24).

I-2 Expression cellulaire

La distribution cellulaire du FT dans l'organisme a été déterminée par des techniques immunohistochimiques (**Tableau I**) (25). On distingue trois catégories de cellules :

◆ Certaines cellules ne produisent pas de FT. Ce sont les lymphocytes, les polynucléaires, de même que les cellules des lignées mégacaryocytaires et érythroblastiques et les plaquettes.

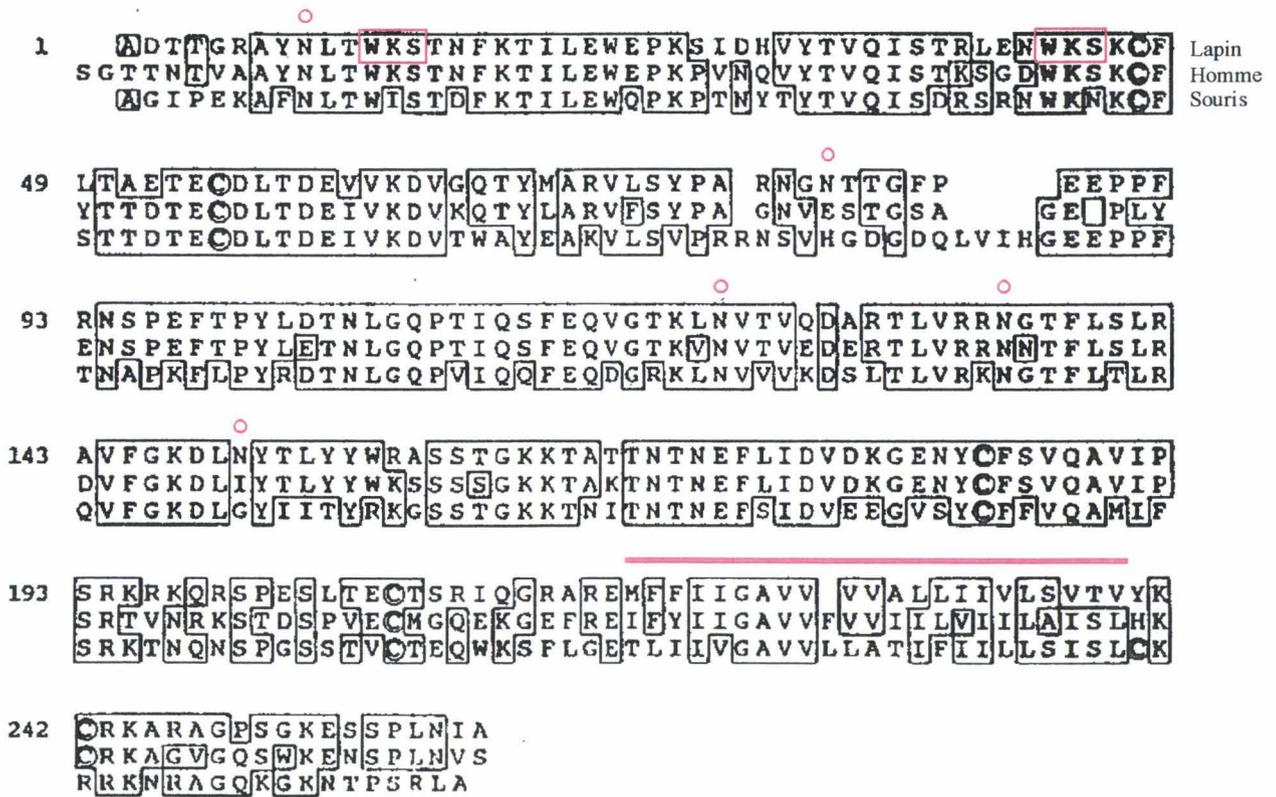


Figure 4 : Séquence en acides aminés du Facteur Tissulaire.
 Comparaison entre trois espèces d'après Pawashe et al. (24).

© : résidus cystéine

○ : Sites de N-glycosylation

Le domaine transmembranaire est surligné en rouge

Aucune expression	Expression constitutive	Expression inducible
Lymphocytes Polynucléaires	Cellules de l'épiderme Cellules des muqueuses Cellules des capsules des organes (foie, rate, rein)	Monocytes/Macrophages Cellules endothéliales
Lignées mégacaryocytaires Lignées érythroblastiques Plaquettes	Cortex cérébral Myocarde Cellules épithéliales Adventice des vaisseaux Cellules de Schwann	Cellules musculaires lisses

Tableau I : Répartition cellulaire du Facteur Tissulaire

Monocytes	Cellules endothéliales	Cellules musculaires lisses
Endotoxine	Endotoxine	PDGF
Complexes immuns	IL-1 β	bFGF
C5a	TNF α	thrombine
IL-1 β	PMA	Angiotensine II
TNF α	LDL modifiées	
PMA	Thrombine	
Interféron γ	Hypoxie	
VLDL		
Cholestérol libre		
LDL modifiées		
P-sélectine		
PF4		
Hypoxie		

Tableau II : Inducteurs de l'expression de Facteur Tissulaire dans les monocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses

◆ De nombreux types cellulaires expriment de manière constitutive le FT. Ce sont les cellules épithéliales, les cellules du cortex cérébral, les cellules de la capsule de différents organes comme le foie, la rate ou le rein et l'adventice des vaisseaux. Le FT n'est présent qu'à de très faible concentration et de façon anarchique dans les cellules musculaires lisses de la média (26). Leur répartition constitue une « enveloppe hémostatique » protectrice prête à induire l'activation de la coagulation quand la continuité vasculaire est interrompue.

◆ Pour les monocytes sanguins, les macrophages des tissus, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, la production de FT est inductible (27-29) et est déclenchée par de nombreux stimuli immunitaires et inflammatoires.

Il faut cependant noter que, même si ces cellules contiennent du FT, elles ne sont pas pour autant procoagulantes. Pour qu'elles expriment totalement leur activité FT, ces cellules doivent être lysées ou exposées à des agents modifiant l'intégrité membranaire tels que les ionophores calciques ou des molécules d'oxydation (30-32). En effet, le FT enchassé dans la membrane cellulaire est rendu inaccessible pour les facteurs VII et VIIa (33-35). Plusieurs mécanismes de contrôle ont été suggérés : soit par la modification de la composition en phospholipides membranaires essentiels à l'activité FT (31,36), soit par une inhibition spécifique de l'activité FT en particulier par le TFPI (37). Or, la présence de FT a été démontrée, in vitro dans des CMLs, au sein de microinvaginations de la membrane plasmatique appelées cavéoles (38). Dès que le contact intercellulaire est rompu par la remise en suspension des cellules, le FT est redistribué au niveau de la membrane et son activité est alors détectable (38).

La distribution du FT dans les cellules endothéliales est encore discutée. Il a été localisé sur la face basolatérale (39), mais également sur la face apicale (40-42) suggérant qu'il existerait deux types de complexes FT-FVIIa, un complexe actif minoritaire situé à la surface

apicale des cellules et un complexe inactif majoritaire situé à la surface basolatérale. En effet, le FT a également été localisé dans des cavéoles (43-44) où il semblerait que sa présence soit le résultat d'une translocation du complexe quaternaire inactif FT-FVIIa-FXa-TFPI (44). Les cavéoles pourraient donc être impliquées dans la régulation dynamique de l'activité procoagulante initiée par le FT.

Si l'expression constitutive de FT par les cellules des tissus joue un rôle essentiel dans l'hémostase normale, son induction dans les cellules du sang ou de la paroi vasculaire est responsable de l'activation de la coagulation impliquée dans la pathogénèse des thromboses, des réactions immunitaires et inflammatoires et des infections.

I-2-1 Expression inductible du FT (Tableau II)

I-2-1-1 Les monocytes

Il est bien établi depuis une vingtaine d'années que l'activité procoagulante des leucocytes est liée aux monocytes. Les monocytes non stimulés au repos ne possèdent pas d'activité FT mais ils répondent à de nombreux agents stimulants. In vitro, l'expression du FT par les monocytes est exclusivement membranaire (36).

Les complexes immuns, les fragments activés du complément (45), l'IL-1 β et le TNF α (46-47) induisent l'expression de FT monocyttaire. Ces inducteurs de l'activité procoagulante, produits lors de l'activation monocyttaire, peuvent également amplifier la réponse obtenue à partir d'autres agents stimulants. Ainsi, le complément synthétisé in vitro par les monocytes activés serait indispensable à une réponse maximale à l'endotoxine (48).

L'endotoxine des bactéries Gram négatif est le plus puissant inducteur direct de l'activité FT (28,49).

L'interféron γ peut induire une activité FT par les macrophages, mais n'agit qu'en co-stimulateur sur les monocytes sanguins (50-51).

Les agents métaboliques comme certaines particules lipidiques, les VLDL et le cholestérol libre (52) peuvent induire une activité procoagulante in vitro. Les LDL sont plutôt connues comme inhibiteurs de la synthèse de cytokines par les macrophages, les LDL oxydées augmentent de façon importante l'activité FT induite par l'endotoxine dans les macrophages et les monocytes adhérents humains (53-54).

Les monocytes activés par les plaquettes produisent du FT. Le mécanisme d'activation des monocytes par les plaquettes nécessite la coopération de différentes molécules : la P-sélectine, molécule d'adhésion synthétisée par les plaquettes (55) et le Platelet Factor 4 (PF4), produit d'activation plaquettaire (56). Le PF4 active les granulocytes qui synthétisent différentes substances en particulier le Platelet Activating Factor (PAF) capable d'amplifier l'expression de FT par les monocytes activés (57). Cependant, le PF4 favorise la formation du complexe anticoagulant thrombomoduline/protéine C (58). Il possède donc un double rôle dans la régulation de l'activité FT.

L'hypoxie est également capable d'induire l'expression de FT des cellules mononucléées accumulées dans les tissus pulmonaires de souris (59).

Les lymphocytes (60) et les granulocytes (57,61) peuvent aussi moduler l'activité procoagulante monocyttaire.

I-2-1-2 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales, sous forme d'une monocouche, tapissent la totalité de la paroi des vaisseaux sanguins. Physiologiquement, elles sont non thrombogènes et constituent une interface où les cellules, extrêmement actives, sont capables de synthétiser une variété de facteurs participant à la régulation de la coagulation et de la fibrinolyse (62).

Parfois l'équilibre se rompt. Ainsi différents facteurs tels que l'endotoxine, l'IL-1 β , le TNF α induisent chez ces cellules l'expression de FT (63). De plus, il a été démontré, in vitro, que la stimulation des cellules endothéliales par l'endotoxine ou l'IL-1 β , aboutit à la

diminution de l'activité de la thrombomoduline constitutive renforçant ainsi l'état procoagulant (27,64).

D'autres facteurs induisent également l'expression de FT par les cellules endothéliales vasculaires. Ainsi, l'hémoglobine humaine amplifie l'expression du FT dans les cellules endothéliales préalablement stimulées par de l'endotoxine (65). Une faible quantité de fibrine peut aussi rapidement induire l'expression du FT des cellules endothéliales en culture (66). Dans certains cas pathologiques comme la septicémie et l'athérosclérose, l'hémoglobine libre et la fibrine pourraient être impliqués dans l'amplification de la coagulation.

Enfin, les cellules endothéliales en apoptose deviennent des cellules procoagulantes par la rapide redistribution de la phosphatidylsérine à la surface membranaire et la diminution d'expression des facteurs anticoagulants tels que la thrombomoduline et le TFPI (67). Mais dans ces cellules en apoptose la synthèse de FT n'est pas modifiée. Le FT stocké deviendrait accessible par les modifications de composition de la surface membranaire.

La présence de FT fonctionnel a également été mise en évidence au niveau du subendothélium d'aorte de lapin ou d'artère ombilicale humaine (68). Le subendothélium étant principalement constitué de protéoglycannes, de collagènes et de microfibrilles, les raisons invoquées de l'existence de FT seraient la présence de vésicules ou de fragments membranaires d'origine endothéliale fixés ultérieurement à la matrice extracellulaire. Comme l'a récemment démontré Mulder et al., les cellules endothéliales stimulées par du TNF α expriment du FT à leur surface plutôt qu'au niveau de la matrice (39).

Le FT au niveau du subendothélium pourrait favoriser la formation de thrombus au niveau des sites d'agression.

I-2-1-3 Interaction monocytes-cellules endothéliales

Lors de l'initiation des lésions athéroscléreuses, lors d'une thrombose, ou lors de la réponse inflammatoire, l'interaction entre les monocytes et l'endothélium vasculaire est un

événement clé. Le recrutement des monocytes est favorisé par des médiateurs solubles et l'interaction cellule-cellule se fait par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires. Différents travaux ont montré que l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales induisait l'expression de FT.

L'expression du FT des monocytes augmente lors de la mise en coculture avec des cellules endothéliales. Cet effet s'intensifie lorsque les cellules endothéliales sont activées par de l'IL-1 β ou par de l'endotoxine (69). Ces observations sont confirmées par d'autres auteurs (70-71). Cette génération de FT est rapide. Les récepteurs impliqués seraient la E-sélectine (70) et le récepteur ICAM-1 (71) mais d'autres voies d'adhésion ne sont pas à exclure puisque les anticorps utilisés contre ces récepteurs ne sont pas totalement efficaces dans l'inhibition de l'expression du FT par les monocytes.

Une étude récente a démontré que l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales provoque une augmentation de l'expression du FT par les cellules endothéliales (72). Ce sont les cytokines (IL-1 β et TNF α) produites par les monocytes stimulés qui sont responsables de cette induction de FT. Le CD18 est le récepteur en partie impliqué.

Les monocytes et les cellules endothéliales sont donc capables d'exprimer du FT après adhésion. L'interaction des monocytes et des cellules endothéliales vasculaires peut jouer un rôle important dans le contrôle de l'expression du FT cellulaire in vivo et pourrait donc favoriser le dépôt de fibrine et la formation de thrombus dans de nombreuses pathologies.

I-2-1-4 Les cellules musculaires lisses (CMLs)

Les CMLs sont la composante majeure de la média des artères saines. Elles jouent un rôle majeur dans l'évolution des lésions athéroscléreuse et dans la cicatrisation des artères après certains gestes de revascularisation comme l'angioplastie. Les CMLs peuvent alors être impliquées dans les accidents thrombotiques car elles sont en contact direct avec le sang circulant et sont le siège de nombreuses modifications.

Bien que l'expression du FT par les CMLs ait été démontrée (30), la régulation de l'activité du FT dans les CMLs artérielles est peu connue. La cinétique d'expression du FT dans les CMLs est différente de celle des cellules endothéliales. L'ARNm et l'activité FT sont rapidement induits en quantité importante dans les CMLs par une variété d'agents impliqués dans la réponse artérielle à l'agression tels que les facteurs de croissance (PDGF, EGF), l'angiotensine II et l' α -thrombine (29). Cette induction semble indépendante de l'activation de la protéine kinase C. Par contre, la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire semble nécessaire à l'expression de l'ARNm et à l'activité FT. De plus, cette accumulation de calcium pourrait aboutir à un changement dans la composition phospholipidique des membranes cellulaires et favoriserait donc l'accessibilité du FT mis en réserve dans des vésicules membranaires (29). En effet, il a été démontré que le FT dans les CMLs est stocké dans trois compartiments différents des cellules. Principalement situé dans le cytoplasme, le FT est également retrouvé dans des vésicules membranaires et au niveau intracellulaire (73).

In vivo, il a été déterminé que les CMLs synthétisent rapidement d'importantes quantités d'ARNm du FT après agression par ballonnet d'une aorte de rat. Parallèlement, l'activité FT augmente. Cette activité se prolonge plusieurs jours avant de revenir à un taux basal (74).

Au cours du processus d'athérosclérose, la rupture de plaque ou l'agression artérielle par ballonnet, les CMLs peuvent être mises en contact avec le sang. L'induction rapide du FT et l'exposition d'une source importante de FT potentiellement actif par les CMLs peuvent être importantes dans la propagation des thromboses précoces associées à une agression.

Le FT pourrait également jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose bien que les travaux entrepris jusqu'alors sont contradictoires. En effet, une étude récente a établi que le FT, par son domaine extracellulaire, est un important facteur de chimiotactisme pour les CMLs, mais qu'il n'a aucun effet sur leur prolifération. Cet effet est comparable à celui obtenu par le PDGF et le bFGF (75). Pourtant un autre travail montre que le FT exprimé par

les CMLs est lié au processus de prolifération. Ainsi l'expression de FT augmente rapidement dans des CMLs remises en croissance. Il semble que l'activité FT, qui est alors très élevée, n'est pas amplifiée après stimulation des cellules par du PDGF (76).

I-2-2 Importance du FT comme récepteur dans les autres types cellulaires

Le FT n'est pas exprimé par les cellules sanguines et l'endothélium à l'état de base, tandis qu'il est présent de façon permanente, dite constitutive, dans des cellules non vasculaires qui ne sont donc pas en contact physiologiquement avec le sang.

Le renouvellement du FT est lent dans les cellules qui l'expriment de façon constitutive, mais il est accessible et est capable de se lier au FVII (25). Il joue à ce niveau le rôle de barrière hémostatique et protège les organes vitaux de lésions tissulaires irréversibles dues à des hémorragies.

Cette distribution non vasculaire importante du FT suggère également qu'il pourrait avoir des fonctions différentes de son activité procoagulante. Aucun individu déficient en FT n'a jusqu'ici été identifié ce qui suggère que le déficit n'est pas viable. Chez des embryons de souris déficients en FT, l'absence de formation d'enveloppes musculaires des vaisseaux primitifs et donc le manque de maturation vasculaire du sac vitellin provoquent un déficit de la circulation vitello-embryonnaire conduisant à la mort des animaux au cours de la gestation (77-78). Une étude similaire a été réalisée chez des souris déficientes en FVII (79). Contrairement aux embryons déficients en FT, les embryons déficients en FVII se développent normalement mais souffrent d'hémorragies périnatales conduisant à la mort des souris (79). Le FT pourrait donc avoir un rôle actif dans le développement des vaisseaux durant le processus d'embryogénèse.

Le FT exprimé dans des cellules de sarcome de souris produit une croissance des cellules tumorales et une vascularisation plus importante des tumeurs, son inhibition retarde leur

croissance suggérant un rôle du FT dans l'angiogénèse (80). Le mécanisme de régulation par le FT des propriétés angiogéniques de ces cellules tumorales semble être dû à l'induction de facteurs angiogéniques (VPF et VEGF) et à une diminution de facteurs anti-angiogéniques (thrombospondine) (80). Par son domaine cytoplasmique, le FT favorise aussi la prolifération métastatique d'une lignée de cellules de mélanome humain et ceci indépendamment de l'activité procoagulante du FT (81). Cependant, la dissémination des cellules tumorales nécessite la fixation du FVIIa au FT (82). L'ensemble de ces données suggère donc que le FT joue un rôle important dans l'angiogénèse, indépendamment de son rôle dans la coagulation. La fonction de récepteur du FT peut expliquer certaines de ces fonctions.

Le FT, d'après sa structure, peut être classer dans la famille des récepteurs de type cytokines de classe II (13). De plus, il possède dans son domaine cytoplasmique des résidus sérines phosphorylables. Enfin, la majeure partie des complexes FT-FVIIa est située à la face basolatérale des cellules exprimant le FT de manière constitutive et est inactive pour la coagulation suggérant un rôle de ces complexes dans la transduction de signaux intracellulaires (42). Cependant, le FT ne possède pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque mais est associé à une région permettant la transduction de signaux. Cette région a été identifiée comme étant une composante du récepteur IgE de type I (83).

Le seul ligand physiologique connu du FT est le FVIIa. Sa fixation au FT peut induire différents messages : variation du calcium cytosolique dans différents types cellulaires en particulier les cellules endothéliales (84-85), induction de la synthèse de VEGF (86) pouvant en retour induire la synthèse de FT (87), modulation de l'expression de différents ARNm dans des fibroblastes humains par l'amplification de la poly(A)polymérase (88). Récemment, une étude a montré le rôle du FT dans l'adhésion et la migration cellulaire (89), processus intervenant lors de la dissémination métastatique, lors du remodelage durant l'angiogénèse ou

lors de l'embryogénèse. En effet, le FT lié au FVIIa fixe la protéine ABP-280, ce complexe conduisant à la réorganisation du réseau d'actine.

Le mécanisme de transduction du signal est encore peu connu, mais il fait certainement intervenir la phosphorylation de différentes protéines kinases (83), telles que les MAP-kinases (90), la PKC (85) ou la FAK (89), cette dernière délivrant des signaux essentiels à la survie et à la prolifération tumorale.

Le FT est donc un élément important en biologie cellulaire. Son rôle en tant que récepteur à part entière permet la transduction de signaux qui peuvent mener au processus d'angiogénèse, favoriser la dissémination métastatique et conduire au processus d'embryogénèse.

I-3 Mécanisme d'action

L'initiation cellulaire de la coagulation par le FT nécessite la présence de différentes molécules : le FVII et ses substrats potentiels les FX et FIX, en présence de phospholipides chargés et en présence d'ions calcium.

Le FVII est une glycoprotéine synthétisée par le foie (91). Sa structure est très proche de celle des autres facteurs de la coagulation vitamine-K dépendants (FIX, FX, protéine C, protéine S, prothrombine). Elle comprend une γ -carboxylation des acides glutamiques situés dans sa région N terminale. Ce domaine, alors chargé négativement, fixe le calcium pour donner au FVII la conformation nécessaire à sa fixation au FT (92). L'activation du FVII en FVIIa se fait par le clivage d'un pont disulfure entre Arg152-Ile153. Le FVIIa est constitué d'une chaîne légère comprenant le domaine Gla et les domaines de type EGF et une chaîne lourde correspondant au site actif (91,93).

Dès que le FT est mis en présence de sang circulant, il forme un complexe avec le FVII plasmatique. La stœchiométrie de la fixation du FVII au FT est de 1:1. Les FVII/VIIa se lient

au FT avec une affinité égale. La fixation du FVII est rapidement suivie de son activation en FVIIa.

Chez des sujets normaux, 1% de FVIIa est retrouvé dans la circulation (94-95). Le FVIIa a une demi-vie relativement longue de 2,5 heures et n'est pas inhibé par l'antithrombine III qui inactive les autres protéases (96-98). L'activité protéolytique qui génère des traces de FVIIa, à l'état physiologique, semble attribuée aux traces de FXa normalement présent dans le plasma (99-101). Le FVIIa circulant sert d'initiateur dans le déclenchement de la cascade de la coagulation.

Le contact entre le FT et le FVIIa entraîne la formation de complexes qui permettent rapidement de générer suffisamment de FXa et de FIXa. Ceux-ci peuvent alors catalyser la conversion du FVII en FVIIa par un processus d'amplification de la réaction. Le FVIIa est donc capable d'activer le FVII fixé au FT. Cette réaction d'autoactivation nécessite la liaison du FVII à une molécule de FT complète intégrée dans une double couche de phospholipides (102-103). La forme tronquée du FT, composée uniquement de sa partie extracellulaire (FTs), associée au FVII ne permet pas cette autoactivation (104). Cependant l'intégration du FTs dans des phospholipides restaure cette capacité. Cette réaction d'autoactivation se produit de façon préférentielle en présence de phospholipides neutres qui sont exprimés par les cellules non activées (105-106). L'association à un environnement phospholipidique membranaire est en effet primordial pour une expression optimale de l'activité procoagulante du FT. Les phospholipides, en particulier la phosphatidylsérine (PS), renforcent la fixation du FVII au FT (107-108). De même, la phosphatidyléthanolamine (PE) augmente la sensibilité à la PS et favorise l'activité du complexe FT-FVIIa reconstitué dans des vésicules contenant peu de PS (109). Les phospholipides interviennent également sur le positionnement du FVIIa (110) et du FX (111) et favorisent alors le clivage et l'activation du FX en FXa (108,112-113). La désorganisation des phospholipides membranaires (31,36) peut changer leur distribution à la

surface cellulaire et donc modifier l'association des facteurs de la coagulation. Les phospholipides pourraient donc jouer un rôle important dans la modulation in vivo de l'activité procoagulante initiée par la voie du FT.

Le FVIIa seul a très peu d'activité fonctionnelle mais sa fixation au FT augmente considérablement son activité catalytique vis-à-vis de ses substrats, les FIX et FX (112,114). Le domaine Gla est la première zone de contact du FVIIa avec le FT (115-116). Ce domaine, par un changement conformationnel du complexe FT-FVIIa, contribue à la stabilité de ce complexe et est nécessaire à la reconnaissance du substrat tel que le FX. Cependant, il a été récemment démontré que le domaine Gla du FVIIa n'était pas nécessaire au positionnement et au maintien du site actif du FVIIa, rôle totalement tenu par le domaine extracellulaire du FT (117). Les domaines EGF, en fixant le calcium, favorisent également les interactions FT-FVIIa (118). La chaîne légère du FVIIa sert de lien de haute affinité afin d'augmenter les interactions entre le FT et la chaîne lourde du FVIIa (119). La fixation du FVIIa au FT apparaît donc comme étant totalement médiée par des interactions protéine-protéine (120-121).

Le FVIIa possède également une activité fonctionnelle indépendante du FT. En effet, chez des sujets hémophiles recevant de fortes doses de FVIIa recombinant, Monroe et al. ont mis en évidence la génération de thrombine. Sa fixation sur les plaquettes activées formant le clou hémostatique initial, rend le FVIIa actif (122).

I-4 Régulation de l'activité catalytique FT-FVIIa

La voie du FT possède deux systèmes inhibiteurs qui régulent l'activité du complexe FT-FVIIa : il s'agit du Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) et de l'antithrombine III (ATIII).

II-4-1 Le TFPI

C'est l'inhibiteur naturel majeur de la voie initiée par le FT (37). Il est encore appelé EPI (Extrinsic Pathway Inhibitor) ou LACI (Lipoprotein Associated Coagulation Inhibitor).

Il est synthétisé de manière constitutive par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Il peut-être aussi synthétisé par les monocytes-macrophages et les cellules trophoblastiques. Secondairement transféré sur les lipoprotéines plasmatiques, le TFPI peut alors circuler dans le plasma.

Le TFPI appartient à la famille des inhibiteurs de protéases de type Kunitz. Il existe trois lieux intravasculaires de stockage du TFPI :

- dans les plaquettes,
- dans le plasma où 90% du TFPI est lié à différents types de lipoprotéines par des liaisons ponts disulfures avec l'apolipoprotéine AII ou le complexe apolipoprotéine AII-apolipoprotéine E, (123)
- à la surface des cellules endothéliales où il est lié à l'héparane sulfate ou à d'autres glycosaminoglycannes. Une mobilisation du TFPI endothélial peut être obtenue par la perfusion d'héparine (124).

In vitro, le TFPI inhibe non seulement l'activité catalytique du complexe FT-FVIIa mais également l'activité fonctionnelle du FXa. Le TFPI se lie tout d'abord au site actif du FXa pour former un complexe binaire dans lequel ce dernier est neutralisé, puis, en présence de calcium, se lie secondairement au même complexe FT-FVIIa pour former un complexe quaternaire TFPI-FXa-FT-FVIIa inactif (37,125).

In vivo, le complexe FXa-TFPI et le TFPI régulent la génération de thrombine en inactivant le complexe FT-FVIIa et le complexe prothrombinase (126).

II-4-2 L'ATIII

L'ATIII n'inhibe pas directement le FVIIa mais agit par deux mécanismes :

- Sa liaison au FVIIa alors complexé au FT entraîne des modifications conformationnelles du FVIIa qui accélère la dissociation des complexes FT-FVIIa (127-128).
- La formation du complexe ATIII-FVIIa rend le FVIIa incapable de se lier à une nouvelle molécule de FT bien qu'elle n'inhibe pas l'activité enzymatique propre au FVIIa (129).

I-5 Schéma de la coagulation (Figure 5)

Les techniques de biologie moléculaire et de biochimie ont conduit à la réévaluation approfondie de la cascade de la coagulation. Dans les années 50, des chercheurs ont avancé le concept de voies séparées (130). Le schéma classique de la coagulation comportait alors deux modes d'initiation appelée voie intrinsèque et voie extrinsèque qui convergent toutes deux vers l'activation du FX et la génération de thrombine. De nombreux arguments indiquent que la voie extrinsèque médiée par le FT-FVIIa est la voie principale de la coagulation in vivo.

Le complexe FT-FVIIa active non seulement le FX mais aussi le FIX (131) mais avec une affinité différente pour ses substrats. En effet, il a été démontré que le complexe FT-FVIIa permettait d'activer beaucoup plus rapidement le FX que le FIX (114,132-133). Lorsque les FIX et FX sont présents simultanément, l'activation du FIX est augmentée, l'activation du FX est diminuée (134). Dès que du FXa est généré, il est rapidement inhibé par le TFPI puis par l'ATIII. Cependant, les traces de FXa générées sont suffisantes pour activer la prothrombine en thrombine, qui elle-même active le facteurs V (FV) et les facteurs antihémophiliques facteur VIII (FVIII) et FIX. Cette amplification de la génération de FXa est encore appelée rétroactivation. La vitesse de génération du FXa par le complexe FIXa-FVIIIa en présence de phospholipides et de calcium est plus élevée que la vitesse d'activation par le complexe FT-FVIIa.

Intrinsic Pathway

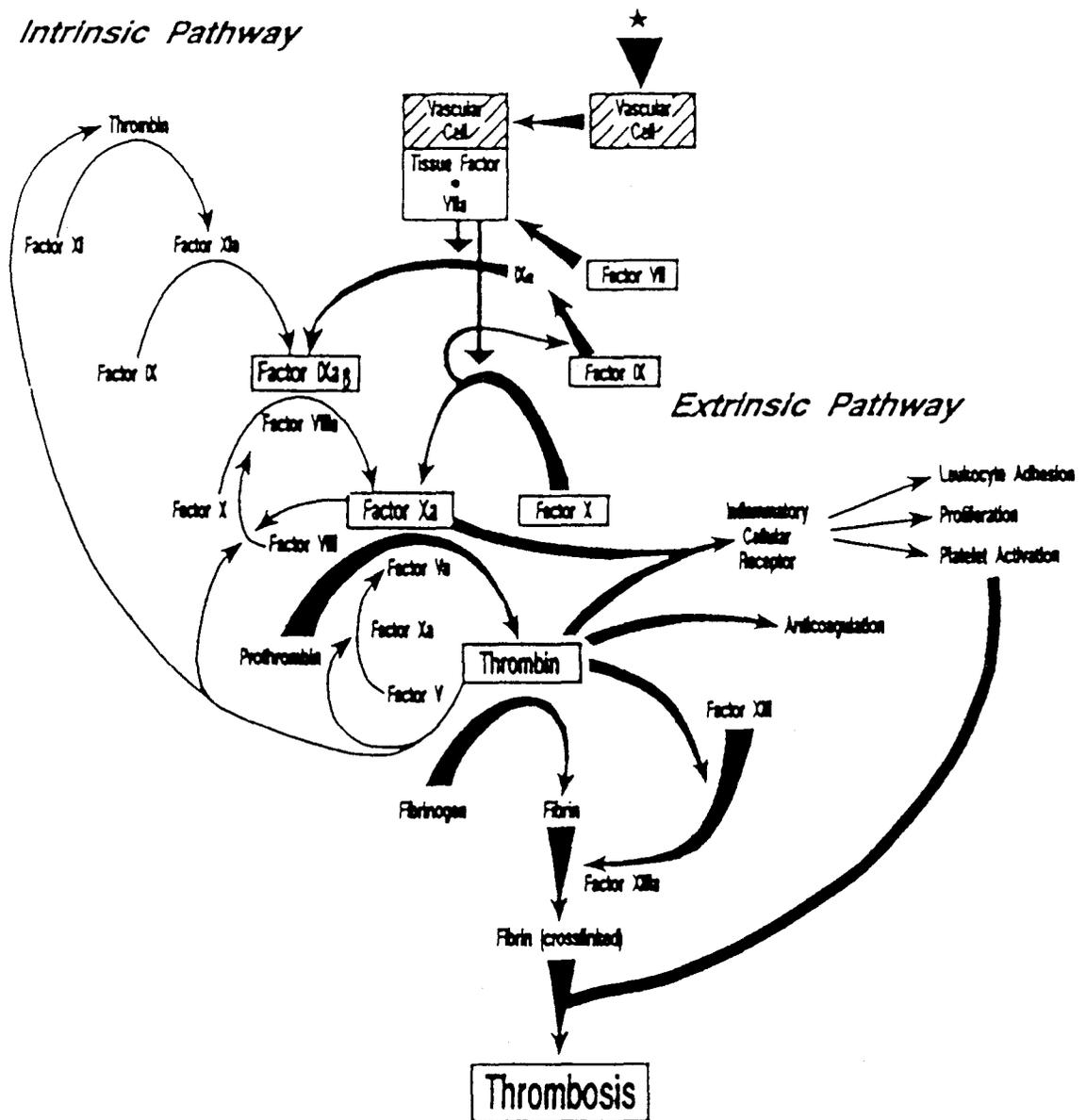


Figure 5 : Schéma de la coagulation d'après Ruf et al. (10).

Le FT serait donc responsable du déclenchement de l'activation de la coagulation et la thrombine de son amplification permettant une génération accrue de FXa et donc une réponse hémostatique plus rapide. Cette amplification de la génération de FXa rend compte des manifestations hémorragiques des hémophiles et de celle parfois sévère des sujets déficitaires en FXI. La voie extrinsèque ou voie du FT est considérée comme la voie physiologique principale de la coagulation tandis que la voie intrinsèque passe au second plan pour l'hémostase normale. Ces observations rendent donc obsolètes le concept des systèmes de coagulation en voies séparées in vivo.

I-6 Régulation de l'expression du FT

Le FT est le principal activateur de la coagulation. L'expression du FT dans les cellules vasculaires telles que les monocytes ou l'endothélium est un élément pathogénique important qui est fortement régulée.

L'induction par l'endotoxine de l'expression du FT par les monocytes est la voie d'activation la plus étudiée à ce jour. Les monocytes, activés ou non, expriment de façon concomitante les gènes codants à la fois pour le cofacteur essentiel de la coagulation, le FT, et son inhibiteur spécifique le TFPI (135).

Les différentes étapes de la synthèse du FT sont les suivantes (**Figure 6**) :

I-6-1 Systèmes transductionnels et seconds messagers

L'expression de FT par les monocytes en réponse à l'endotoxine est rendue possible par l'interaction de l'endotoxine avec la surface membranaire des monocytes. Il y a alors activation de systèmes transductionnels, puis génération de seconds messagers qui transmettent le signal vers le noyau.

A la surface des monocytes, il existe plusieurs sites de fixation pour le lipide A de l'endotoxine : la molécule CD18 qui constitue les β 2-intégrines, la molécule CD14, une

protéine de 80 kDa et une lectine interagissant avec la partie polysaccharidique de l'endotoxine.

Toutes ces molécules n'induisent pas de façon directe l'apparition de seconds messagers. Ainsi, l'emploi d'anticorps spécifiques a permis de déterminer que les β 2-intégrines n'interviennent pas directement dans la synthèse de FT ou de cytokines mais agissent comme co-stimulants (136-137).

La molécule de CD14, glycoprotéine ancrée dans la membrane monocytaire, fixe de manière spécifique l'endotoxine libre ou liée à la LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein) (138-139). Cependant la présence de concentrations saturantes d'anticorps anti-CD14 n'inhibe pas totalement la synthèse de cytokines par les monocytes, ce qui suggère l'implication d'autres molécules dans la production de FT et de cytokines par les monocytes stimulés par l'endotoxine (136,139). La molécule de CD14 est liée à une activité tyrosine kinase. Elle peut donc générer des seconds messagers (140).

Suite à la fixation de l'endotoxine, apparaît l'activation des signaux transductionnels et l'envoi de seconds messagers permettant l'activation de la transcription du gène du FT (49). Ces mécanismes mettent en jeu des réactions de phosphorylations/déphosphorylations similaires à d'autres voies d'activation monocytaire (141).

L'endotoxine, par l'intermédiaire d'une protéine G, active la phospholipase C. Celle-ci est responsable de la formation d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) qui permettent l'entrée de calcium dans le compartiment intracellulaire. Cette augmentation de calcium active la protéine kinase C (141). L'induction de FT monocytaire par l'endotoxine est donc dépendante de l'activation de la protéine kinase C (142-143) mais aussi de l'activation d'une protéine tyrosine kinase (144-145).

Les inhibiteurs de la phospholipase A2 diminuent la synthèse de FT, suggérant un rôle possible de la voie de la lipoxygénase (146).

L'AMP cyclique, par son effet modulateur sur la concentration en calcium intracellulaire (141), inhibe de façon dose-dépendante la transcription du gène du FT (147). La concentration de calcium intracellulaire permet de moduler l'activité FT à la surface de la membrane des monocytes (148).

Il semble que les canaux potassiques soient également impliqués dans la régulation de la synthèse du FT par les monocytes, sans doute par l'hyperpolarisation de la membrane monocyttaire facilitant ainsi la mobilisation du calcium (149).

Une partie du FT est stocké dans des vésicules membranaires, ou se situe dans un pool intracellulaire qui le rend inaccessible pour le FVII et/ou le FX. Ceci suggère deux voies de régulation du FT :

- au niveau de la synthèse de FT ou de son transport vers la membrane ;
- au niveau des modifications posttranslationnelles et/ou conformationnelles du

FT dans la membrane, avant de former un complexe actif avec le FVIIa.

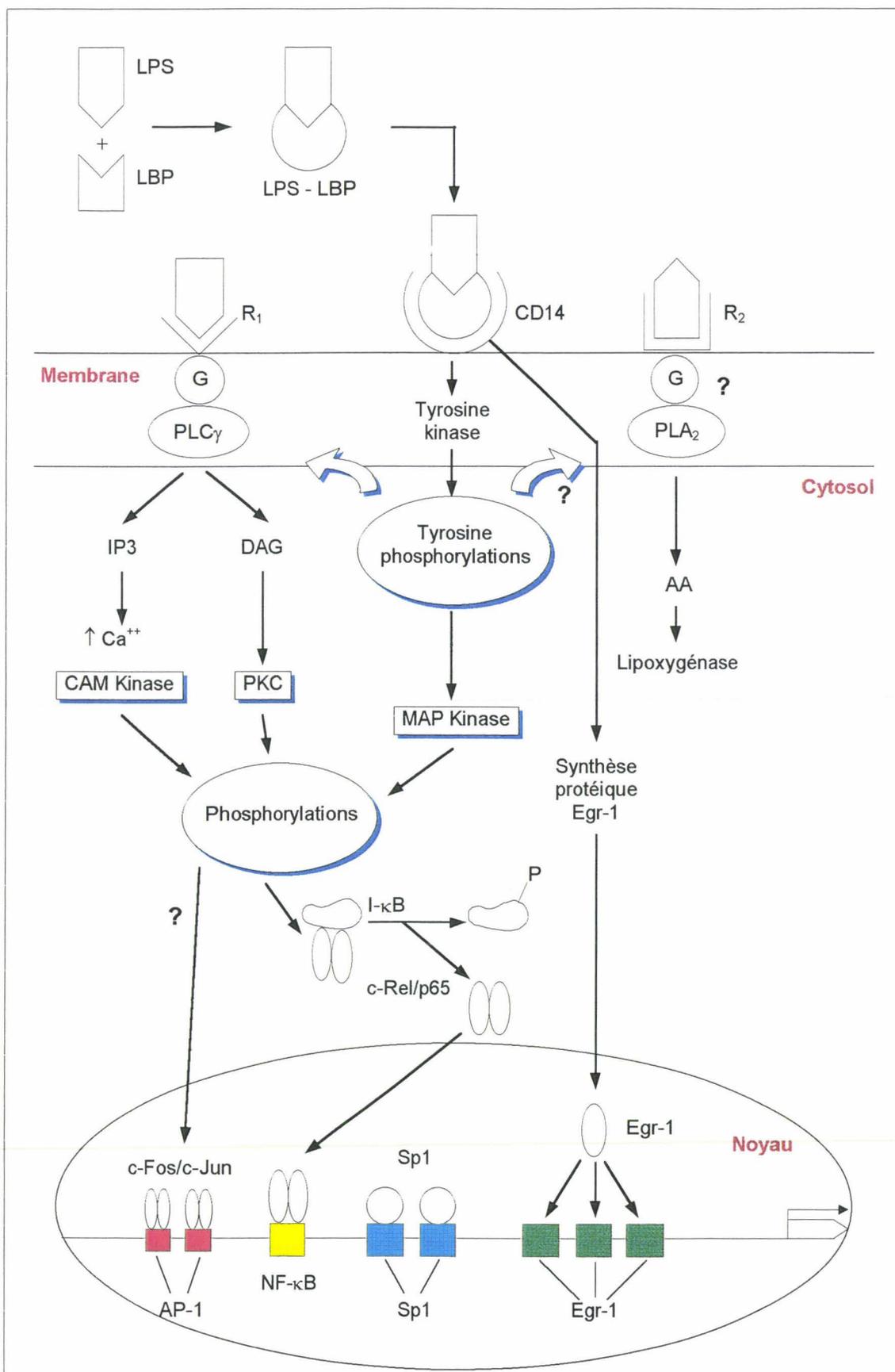


Figure 6 : Schéma de l'induction par l'endotoxine du FT dans les monocytes d'après De Prost (49) et Mackman (9).

I-6-2 Régulation de l'expression du gène du FT

Les travaux de Mackman et al. ont montré que la production du FT par les monocytes en réponse à l'endotoxine était régulée par des mécanismes transcriptionnels (**Figure 7**) et posttranscriptionnels (150).

Le facteur de transcription Sp1 est une protéine initiant la transcription de nombreux gènes (151). Il peut se fixer sur 5 GC box situés dans le promoteur du gène du FT. Sp1 est alors responsable d'une expression minimale du FT par les monocytes non stimulés. Les protéines hétérodimères c-Fos/c-Jun sont déjà fixées à l'état de repos sur les deux sites AP-1 mais ne contribuent pas à l'expression basale (**Figure 8**) (152).

La transcription du gène en réponse à l'endotoxine est médiée par une séquence stimulatrice (ou enhancer) encore appelée séquence LRE (Lipopolysaccharide Response Element) (**Figure 9**). Cette séquence contient deux sites AP-1 (Activation Protein-1) et un site NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) (153). Ces trois sites sont nécessaires à une réponse maximale de l'induction du FT par l'endotoxine (152). Les protéines hétérodimères c-Fos/c-Jun sont déjà fixées à l'état de repos sur les deux sites AP-1 (152). L'activation de la transcription par l'endotoxine s'accompagne de l'activation des facteurs de transcription NF- κ B/Rel (154). Ce sont les hétérodimères c-Rel/p65 qui se fixent sur le site NF- κ B (155). La formation des complexes c-Fos/c-Jun et c-Rel/p65 au niveau de la séquence LRE facilite l'interaction fonctionnelle de ces complexes, interaction qui permet d'activer la transcription (**Figures 6 et 8**) (152).

Les protéines de transcription sont capables de se fixer à l'ADN après leurs modifications posttransductionnelles en particulier en fonction de leur état de phosphorylation (144).

Le fonctionnement général du gène du FT en fait un gène à réponse rapide, comme les gènes des récepteurs des cytokines, dont l'expression est indépendante de la synthèse protéique (156).

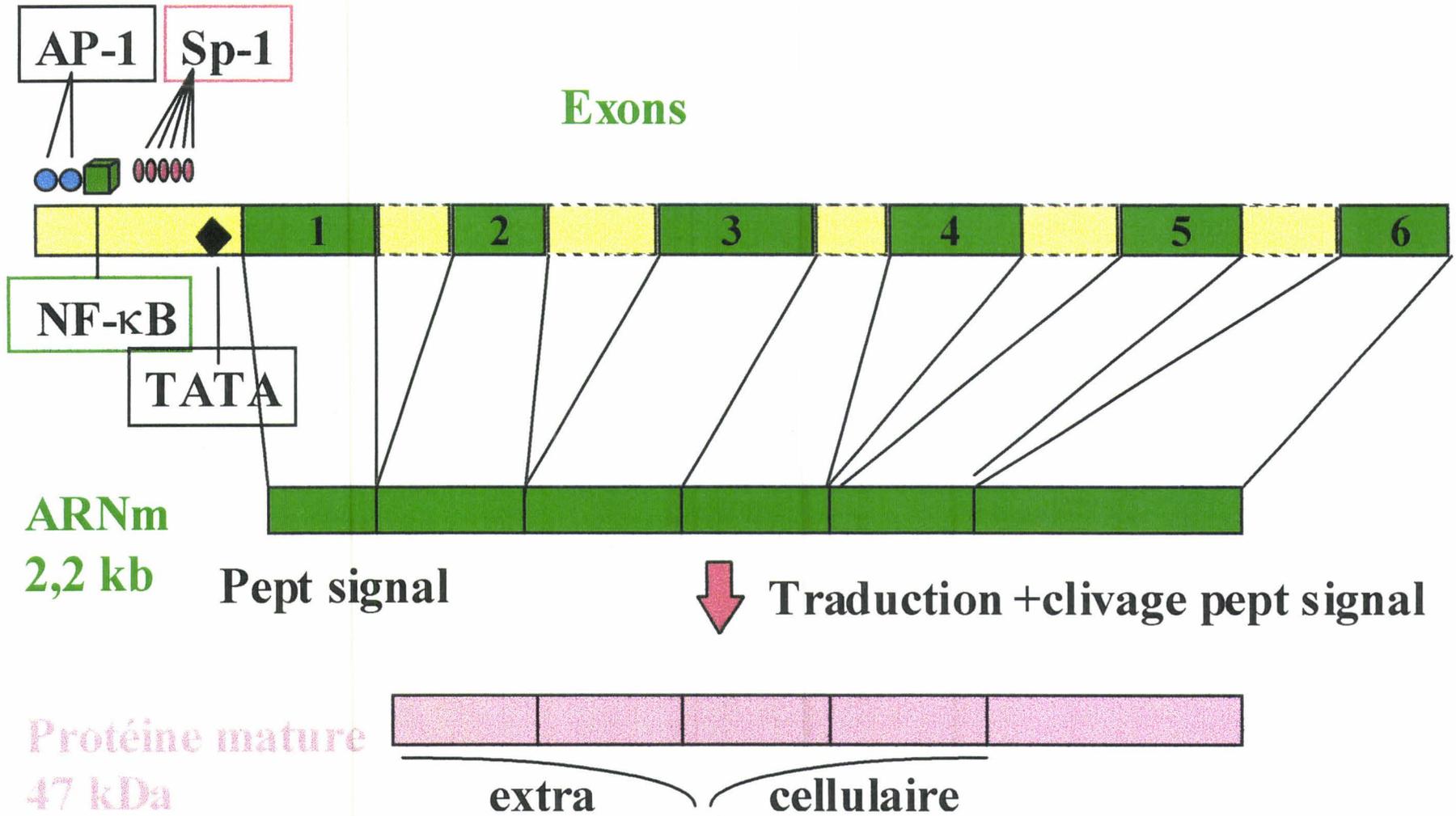


Figure 7 : Structure du gène du Facteur Tissulaire

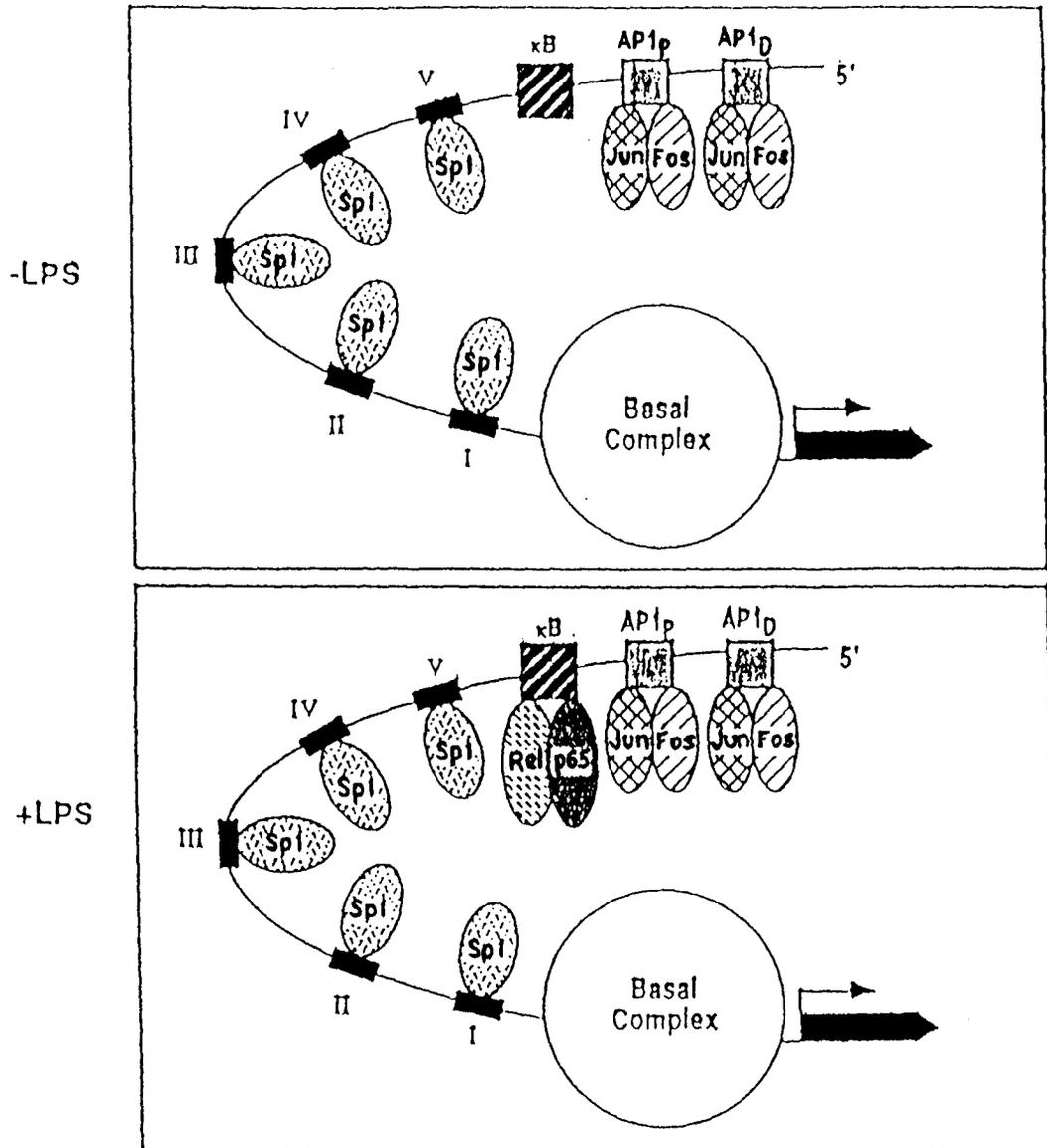


Figure 8 : Schéma de l'expression basale ou induite par l'endotoxine du gène du Facteur Tissulaire par les monocytes d'après Oeth et al. (152).

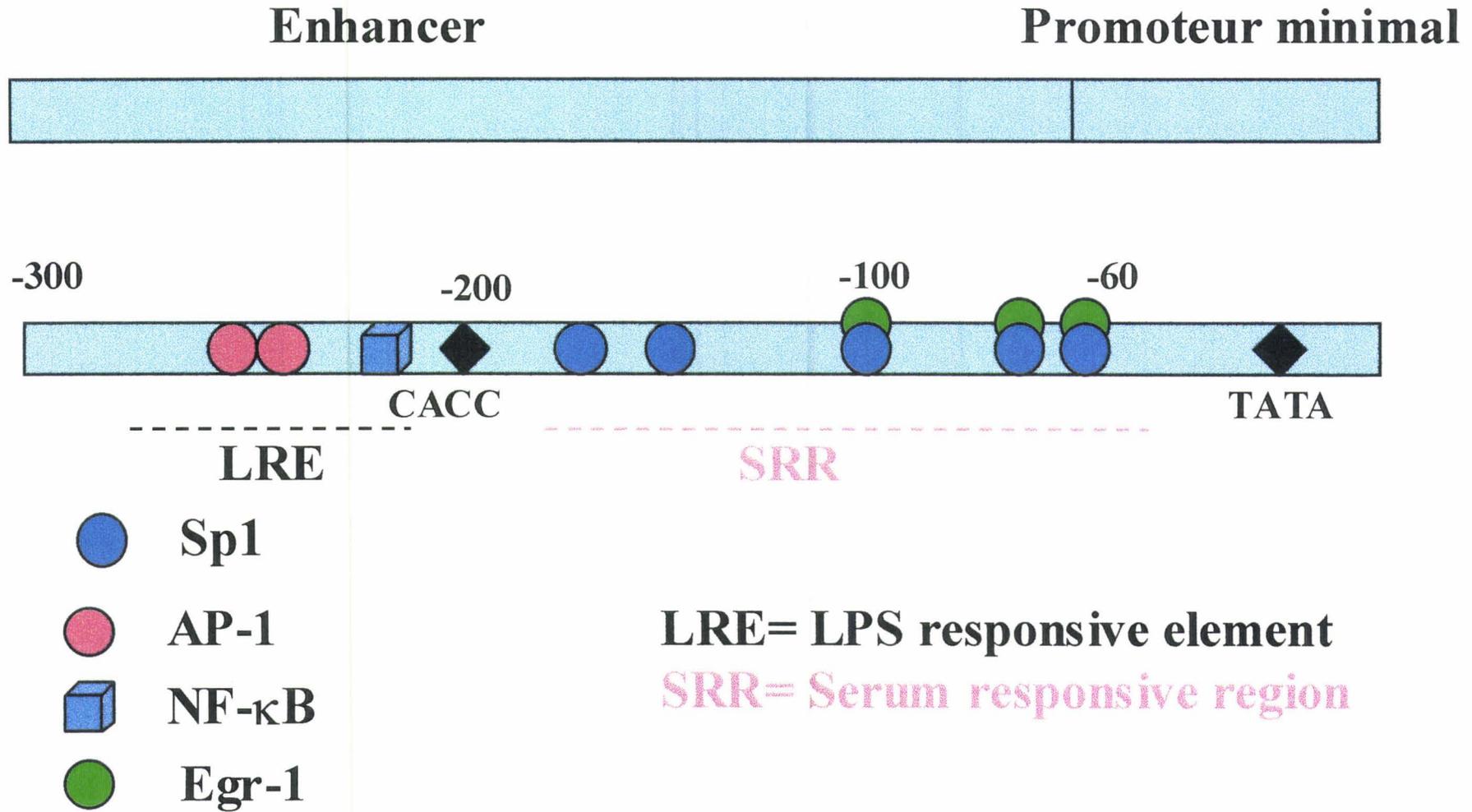


Figure 9 : Structure de la région promotrice du gène du Facteur Tissulaire

L'ARNm, déterminé par Northern Blot, a été identifié sous forme de deux bandes de 2,2 et 3,1 kb. Cette dernière bande moins abondante et inconstante correspond à l'épissage incomplet de l'intron 1. Ce transcript ne permet pas la production de la protéine FT car il contient un codon stop empêchant sa traduction (157). L'ARNm du FT a une demi-vie de courte durée déterminant son instabilité. L'endotoxine favorise la stabilisation des transcripts par un allongement de leur demi-vie (150). Cet effet de l'endotoxine est transitoire et est observé dans les premières heures de la stimulation.

I-7 Autres voies d'activation de la coagulation sur la membrane monocytaire

Le monocyte peut activer la coagulation par d'autres voies indépendantes de la voie du FT. En effet, le FX, par sa liaison au CD11b/CD18 (ou Mac-1), est clivé en FXa (158-159). Ce clivage peut être initié par la cathepsine G synthétisée après fixation du ligand à Mac-1 ou lors d'un processus inflammatoire (160). L'importance de cette voie d'activation de la coagulation a d'ailleurs été démontrée in vivo lors d'une infection bactérienne (161). La cathepsine G peut également activer le FV en FVa qui est un cofacteur du complexe prothrombinase fixant le FXa. Le complexe alors formé constitue une autre voie d'activation de la coagulation indépendante du FT (162-163).

Le FXa est également un ligand qui, lorsqu'il est fixé à son récepteur EPR-1 (Effector Cell Protease Receptor-1) présent dans les monocytes (164), les cellules endothéliales (165) et les CMLs (164,166), est capable d'induire la transduction de signaux cellulaires. Ainsi, le FXa est responsable de l'augmentation du calcium cytosolique de cellules endothéliales (167). Il possède aussi une activité mitogène pour les CMLs (168-169) et les cellules endothéliales (165). Le complexe FXa-EPR-1 induit également la génération de thrombine par la formation du complexe prothrombinase (166,170-171) ou par l'induction de l'expression de FT (172).

L'endotoxine induit l'émission par les monocytes de microvésicules riches en PS, en molécules d'adhésion et en FT (173). Cette dissémination de vésicules dans la circulation favorise la propagation de l'activité procoagulante aux cellules vasculaires avoisinantes, en particulier les cellules endothéliales, et peut donc entraîner un processus thrombotique (174-175).

II ROLE DU FACTEUR TISSULAIRE EN PATHOLOGIE VASCULAIRE

De nombreux travaux ont été consacrés aux modifications d'expression du FT en pathologie. Les premiers d'entre eux se sont intéressés aux monocytes circulants, ces cellules étant plus accessibles et plus sensibles individuellement aux stimuli infectieux et inflammatoires que les cellules endothéliales. Très récemment, la mise en œuvre de techniques immunohistochimiques et de biologie moléculaire à partir de coupes tissulaires a permis de progresser nettement dans la compréhension du rôle du FT en pathologie.

II-1 Pathologie vasculaire artérielle

Les maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose sont actuellement la principale cause de décès et de morbidité dans les pays industrialisés. La plaque athéroscléreuse résulte d'un épaissement focal de l'intima. L'athérosclérose ne touche que les artères de gros et moyen calibre. La survenue d'une thrombose, au niveau d'une plaque athéroscléreuse rompue est un facteur déterminant dans la pathogénèse des syndromes coronaires aigus, tel que l'angor instable et l'infarctus du myocarde. La rupture de plaque peut entraîner la formation d'un thrombus totalement ou partiellement occlusif, déterminant un accident clinique aigu. Parmi les facteurs qui déterminent la thrombogénicité de la plaque, le FT joue probablement un rôle important. Son importance dans la thrombogénèse artérielle in vivo est suggérée par

des données épidémiologiques puisqu'il a été démontré que la concentration plasmatique du FVII était un élément prédictif de mortalité cardiovasculaire (176).

II-1-1 FT et plaques d'athérosclérose

Au niveau des vaisseaux normaux, l'ARNm du FT a été trouvé en grande quantité dans l'adventice des artères y compris les artères coronaires. Il n'est cependant pas détectable dans l'endothélium ou l'intima normale, et faiblement retrouvé au niveau des CMLs constituant la média (26).

L'architecture des plaques athéroscléreuses et leur composition cellulaire dans les lésions responsables d'infarctus du myocarde sont hétérogènes (26,177). Mais invariablement, le site de rupture ou d'érosion est le siège d'une inflammation et la majorité des plaques rompues contiennent des quantités importantes de débris cellulaires et de lipides extracellulaires (178). Les plaques sur le point de se rompre ou déjà rompues sont également riches en cellules spumeuses et en lymphocytes T. Ceci suggère que l'inflammation joue un rôle dans la déstabilisation du manteau fibreux. Par contre, les plaques qui présentent une chape fibreuse importante sont constituées de matrice extracellulaire, essentiellement composée de collagène, et de CMLs.

De nombreuses études ont analysé l'expression du FT dans l'athérosclérose humaine. La présence de FT au sein d'une plaque athéromateuse humaine a été mise en évidence pour la première fois en 1972 par immunohistochimie (179). Le FT a ensuite été mis en évidence sur des fragments d'endartérectomie carotidienne par techniques immunohistochimiques et par hybridation in situ (26), puis sur des fragments provenant d'athérectomie coronaire par immunohistochimie (180). Plus récemment, par technique fonctionnelle, il a été démontré que le FT est fonctionnellement actif et donc capable d'activer la coagulation (181). Le FT est mis en évidence au niveau des cellules spumeuses, d'origine musculaire ou macrophagique, et aussi dans les îlots de nécrose contenant également des lipides oxydés, des cristaux de

cholestérol et des médiateurs de l'inflammation. Par fixation des FVIIa et FX préalablement marqués, il a été démontré que le FT est également très abondant dans le cœur lipidique acellulaire et, pour la première fois, a été détecté au niveau de l'endothélium recouvrant les plaques (182). Il a également été retrouvé dans les plaques d'athérome riches en lipides (183). Le FT est donc un élément constitutif des plaques athéroscléreuses.

Le FT présent dans la plaque d'athérome provient probablement des macrophages. En effet, des macrophages isolés de plaques athéroscléreuses carotidiennes expriment une forte activité FT (184). De plus la surcharge lipidique en cholestérol et en LDL oxydées est capable d'induire une augmentation d'expression du FT par les macrophages, de même que le processus inflammatoire existant au niveau du site de rupture. Cependant, le FT peut également provenir des CMLs (185). L'origine endothéliale du FT reste à confirmer.

L'ensemble des études anatomopathologiques concernant les plaques d'athérome fait ressortir la grande hétérogénéité des plaques quant à leur richesse en FT. Une expression accrue de l'antigène FT prédomine dans des pièces d'athérectomie coronaire de patients en angor instable par rapport à celles de patients en angor stable (185). Le FT est surtout retrouvé dans les zones cellulaires des pièces de patients en angor instable en particulier au niveau des macrophages (186), alors que le FT retrouvé dans les pièces des patients en angor stable est plutôt situé dans les zones acellulaires (185). L'augmentation de l'activité et de l'antigène du FT a aussi été majoritairement trouvée dans des fragments d'athérectomie coronaire de sujets ayant présenté un infarctus du myocarde par rapport à ceux provenant de patients en angor stable (187).

II-1-2 FT et monocytes circulants

Le FT peut également être impliqué dans les complications de l'athérosclérose par l'intermédiaire des monocytes sanguins circulants. Différents travaux indiquent qu'une activation leucocytaire est détectable dans le sang des patients souffrant de maladies coronaires. Au cours de l'angor instable, il existe une augmentation d'expression des molécules d'adhésion CD11b/CD18 par les leucocytes (188). Au niveau des monocytes, cette activation se traduit par une augmentation de l'expression de FT (189), qui n'est pas retrouvée chez les sujets en angor stable (190-191). Ces résultats suggèrent un processus inflammatoire évolutif au cours de l'angor instable.

La réalité d'une exposition de FT in vivo par les monocytes au cours de l'angor instable n'est pas démontrée et le rôle joué par le FT monocyttaire dans l'évolution du thrombus coronaire reste incertain. Cette activation est sans doute plutôt une conséquence qu'une cause de l'angor instable. En effet, il a été démontré que l'activation cellulaire était plus importante dans le sinus coronaire que dans la circulation systémique (188). De plus, il n'y a pas d'activation systémique importante des monocytes dans l'infarctus du myocarde (191). Une participation des monocytes activés à la croissance du thrombus et à l'instabilité de la plaque est possible.

II-1-3 FT, angioplastie et resténose

L'angioplastie coronaire est une technique de revascularisation largement utilisée. Ses principales complications sont la thrombose secondaire, pouvant entraîner une réocclusion aiguë, et la resténose, processus évolutif au cours des 6 premiers mois impliquant une prolifération néointimale mais surtout un défaut de remodelage vasculaire. La réocclusion aiguë est liée à la formation d'un thrombus impliquant l'adhésion des plaquettes au subendothélium et l'activation de la cascade de la coagulation.

De nombreux modèles expérimentaux ont permis d'étudier la formation du thrombus secondaire à une agression artérielle mécanique. Chez le lapin ou le rat, la dénudation endothéliale sévère ou non, ne provoque pas de dépôt de fibrine (192-193). Mais, une seconde dénudation de la néointima formée entraîne un dépôt de fibrine (194).

Plusieurs éléments établissent une relation entre FT et thrombose postangioplastie. Des cellules endothéliales stimulées ou une matrice extracellulaire, exprimant du FT, sont un support très efficace de formation d'un thrombus fibrineux et plaquettaire *in vitro* (195). Chez le lapin, l'angioplastie par ballonnet provoque une activation prolongée de la coagulation au niveau de l'artère lésée, activation médiée par le FT (196). La thrombogénicité peut être abolie par l'utilisation d'un anticorps anti-FT (197). Cette activation de la coagulation est également retrouvée dans un modèle porcin d'angioplastie coronaire (198). L'expression du FT après angioplastie se produit au niveau des CMLs. En effet, l'angioplastie par ballonnet induit chez le rat une expression d'ARNm de FT et une activité FT au niveau de la paroi lésée et plus particulièrement des CMLs (74). Cette expression est à la fois rapide (2 heures pour l'ARNm) et durable (plus de 48 heures). La réponse initiale à la dénudation est une expression rapide de FT par les CMLs de la média. Ce FT est protégé de la circulation par un ensemble d'éléments (lame élastique, couche plaquettaire, endothélium régénéré), mais lorsqu'une deuxième agression vasculaire se produit le FT est alors mis en contact avec le sang circulant et active la cascade de la coagulation et donc favorise les dépôts de fibrine. De plus, l'angioplastie par ballonnet est susceptible d'induire l'exposition de FT au niveau de la plaque d'athérome écrasée.

Il paraît donc possible que le FT joue un rôle dans les occlusions thrombotiques postangioplastie.

La resténose est le fruit d'une prolifération des CMLs stimulées par des facteurs de croissance tels que le PDGF ou le bFGF sécrétés par les plaquettes, les macrophages et les

CMLs elles-mêmes (199). Le FT pourrait également jouer un rôle dans le processus de resténose. L'expression de FT permet d'activer le FX et de générer de la thrombine. Or, il a été démontré que le FX et la thrombine sont des facteurs de prolifération néointimale après angioplastie (167,200). De plus, chez l'animal, les inhibiteurs de la voie du FT sont plus efficaces dans la prévention de la resténose que les inhibiteurs plus tardifs de la génération de thrombine (201). Le FT possède également des propriétés angiogéniques propres indépendantes de son activité procoagulante. Il accentue l'activité mitogénique des cellules endothéliales par une augmentation de la transcription de facteurs de croissance tels que le VEGF et une diminution de la transcription de molécules antiangiogéniques telles que la thrombospondine (80).

Le FT, initiateur principal de la génération de thrombine *in vivo*, est exprimé à différents niveaux et dans différentes circonstances en pathologie coronaire : au niveau de la plaque d'athérome, des monocytes circulants au cours de l'angor instable et des CMLs après angioplastie. Le FT joue un rôle significatif dans les thromboses après angioplastie associées à une rupture spontanée de la plaque.

II-1-4 FT et apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est associée au processus physiologique de renouvellement tissulaire mais également à différentes physiopathologies telles que le processus inflammatoire et l'athérosclérose. Dans ce second cas, l'apoptose joue un rôle primordial en agissant sur les CMLs (202-203), sur les lymphocytes (204-205).

Physiologiquement, la mise en évidence du FT dans des cellules en croissance ou perpétuellement renouvelées suggère que le FT peut être associé au renouvellement cellulaire (25, 206-207). Une des voies de régulation de l'activité FT est sa séquestration au sein de la membrane cellulaire par un mécanisme encore peu connu mais faisant certainement intervenir la composition en phospholipides des membranes cellulaires en particulier en PS (36,208),

phospholipide essentiel à l'activité FT (107). Or, l'apoptose est associée à l'altération des membranes cellulaires conduisant à l'exposition de PS (209), et pourrait donc, à ce titre, être un inducteur de l'activité procoagulante liée au FT. L'association apoptose et FT a été étudiée in vitro dans différents types cellulaires. Une étude dans des fibroblastes a démontré une réorganisation de l'expression du FT associée à une augmentation de l'activité FT (210). Cette observation a également été faite dans des cellules endothéliales préalablement stimulées par de l'endotoxine (67,210) et dans une lignée monocytaire (211). Enfin, des CMLs vasculaires en apoptose génèrent de la thrombine sans doute par la voie du FT (212). In vivo, ces cellules en apoptose se détachent et pourraient constituer de véritables corps procoagulants disséminant l'activité procoagulante liée au FT.

Récemment, il a été démontré que le degré d'apoptose est corrélé au nombre de particules membranaires émises par les différents types cellulaires (213). Or, des particules d'origine monocytaire et lymphocytaire sont retrouvées en grande quantité dans des plaques d'athérosclérose humaines et possèdent une activité procoagulante importante liée au FT (214).

L'association FT et apoptose pourrait donc jouer un rôle primordial dans la thrombogénicité des plaques d'athérosclérose.

II-1-5 Facteurs responsables de la présence du FT dans les plaques athéroscléreuses

Les facteurs à l'origine de l'expression du FT dans les plaques athéroscléreuses restent hypothétiques. Deux hypothèses ont été émises, l'une liée aux anomalies du métabolisme lipidique, l'autre liée à un processus infectieux.

Les plaques athéroscléreuses contiennent de grandes quantités de lipides et sont également riches en cellules spumeuses d'origine macrophagique. Après induction par du cholestérol libre ou des LDL oxydées, ces cellules sont capables d'exprimer du FT.

L'implication des infections virales (virus de l'herpes simplex 1 ou cytomégalovirus) ou bactériennes (*Chlamydia*, *Helicobacter*) dans l'évolution des plaques athéroscléreuses est suggérée depuis une vingtaine d'années (215).

La présence du cytomégalovirus a été mise en évidence dans des vaisseaux athéromateux humains (216), et dans des pièces d'endartérectomie (217). Le cytomégalovirus favorise la prolifération cellulaire en bloquant le processus d'apoptose (218) et pourrait donc intervenir dans la resténose post-angioplastie (219). Le cytomégalovirus latent est essentiellement mis en réserve dans les monocytes/macrophages (220). In vitro, il devient actif lorsque les monocytes/macrophages entrent en contact avec les cellules endothéliales, ou les CMLs, ou après stimulation par des LDL oxydées (221). Les infections à cytomégalovirus provoquent une augmentation de la thrombogénicité des cellules endothéliales (222), et activent le facteur de transcription NF- κ B qui stimule de nombreux gènes à réponse précoce et en particulier le FT (223).

Une souche de *Chlamydia*, dont la paroi est proche de celle des bactéries gram négatif, a été détectée dans des plaques d'athérectomie humaine (224). Elle a également été isolée de pièces d'endartérectomie (217).

Ces données suggèrent qu'un facteur infectieux pourrait être un facteur aggravant dans les processus d'athérosclérose et de resténose (225). La connaissance des mécanismes infectieux est importante pour le développement de stratégies thérapeutiques des maladies vasculaires.

II-2 Coagulation Intravasculaire Disséminée (CIVD)

Les manifestations du choc septique après infection s'accompagnent notamment d'un état d'hypotension et d'une coagulation vasculaire disséminée (CIVD). L'activation de la coagulation sanguine conduit à la génération et aux dépôts de fibrine et à la formation de thromboses microvasculaires. Ces atteintes peuvent se compliquer d'une dysfonction de plusieurs organes appelée syndrome de défaillance multiviscérale.

L'importance de l'expression du FT monocyttaire dans l'activation de la coagulation ou du choc septique a été progressivement démontrée par des études expérimentales et cliniques. C'est d'ailleurs l'étude de la CIVD induite par l'endotoxine qui est la mieux documentée quant au rôle essentiel du FT.

Les mécanismes physiopathologiques du choc septique sont complexes. La production par les monocytes activés de deux cytokines, l'IL-1 et le TNF α jouent un rôle capital dans la CIVD. Ces deux médiateurs sont capables d'induire eux-mêmes la synthèse de FT par les monocytes et par les cellules endothéliales. De même, l'endotoxine est le meilleur inducteur de l'expression de FT par ces cellules.

L'injection chez le lapin de leucocytes exprimant du FT entraîne une CIVD (226). Des animaux résistants à l'endotoxine montrent une réduction significative de la production de FT par les monocytes après injection d'endotoxine (227). Les cellules mononucléées jouent donc un rôle clé dans la CIVD induite par l'endotoxine.

Les mécanismes conduisant à la génération de FT in vivo ne sont pas totalement établis. Semeraro et al. ne montrent pas d'expression d'ARNm de FT par les monocytes de rat (228), tandis que d'autres études le démontrent chez ces animaux (229-230). L'expression de FT n'est pas retrouvée dans les cellules endothéliales (229-230). De même, l'injection d'endotoxine chez le lapin conduit à une augmentation de l'activité procoagulante des cellules mononucléées de diverses origines (sang, rate, et moelle osseuse) et de l'endothélium aortique

(231-233). Chez la souris, l'injection d'endotoxine conduit à une augmentation de l'ARNm du FT dans les cellules alvéolaires, les cellules épithéliales mais pas dans les cellules endothéliales (234). Chez le babouin, l'injection d'*Escherichia coli* induit la formation de dépôts de fibrine. Le FT est également exprimé au niveau des cellules endothéliales de la rate, des cellules épithéliales et glomérulaires (235).

L'ensemble de ces données démontre que l'expression de FT en réponse à l'endotoxine ou aux bactéries Gram négatif est augmentée dans la circulation sanguine ainsi que dans des organes cibles essentiels mais ne détermine pas de façon certaine le rôle relatif de chaque type cellulaire dans la progression de la CIVD.

Dans différents modèles animaux, la prévention de l'état d'hypercoagulabilité et la prévention de la mortalité causée par l'endotoxémie ont été rendues possibles par l'utilisation d'anticorps anti-FT ou anti-FVII/FVIIa, ou par le traitement avec du TFPI.

Chez le lapin, l'injection d'anticorps anti-FT diminue la CIVD induite par l'injection d'endotoxine ou l'injection de FT mais ne prévient ni le choc ni le décès. L'inhibition de la coagulation à des stades plus tardifs entraîne les mêmes effets (236-237). Par contre dans un modèle de sepsis expérimental chez le primate, l'injection d'anticorps anti-FT ou anti-FVIIa ou l'injection de TFPI diminue la CIVD et améliore la survie (238). L'avantage de ces traitements par anticorps anti-FT est la préservation de la réponse inflammatoire en maintenant les taux de $\text{TNF}\alpha$, facteur antibactérien important.

Après injection d'endotoxine ou de FT à des lapins, les taux de TFPI mesurés sont normaux et ne préviennent pas la CIVD alors que de fortes doses injectées de TFPI en sont capables (236,239-240). Chez le babouin, de fortes doses de TFPI, administrées dans les premières heures suivant l'injection d'une dose létale d'*Escherichia coli*, atténuent l'activité procoagulante et diminuent la mortalité. Une diminution du taux d'IL-6 est observée mais le taux de $\text{TNF}\alpha$ reste élevé (241).

D'autres anticoagulants ont été testés pour leur efficacité à prévenir la CIVD. La protéine C activée (242) et l'ATIII (243) protègent les babouins d'un choc léthal à *Escherichia coli*. Cependant, dans ce même modèle, le prétraitement avec un inhibiteur du FXa (DEGR-Xa) n'empêche pas la mortalité ce qui suggère l'inefficacité de cet anticoagulant (244).

Chez l'homme, les cellules mononucléées de sujets atteints de méningococcémie expriment une activité FT détectable et d'autant plus importante que l'évolution est grave (245). Cette activité FT des monocytes est également retrouvée chez des patients présentant une péritonite (246). Le rôle du FT dans l'induction par une faible dose d'endotoxine d'une activation de la coagulation a aussi été démontré chez des volontaires sains (247-248). Il n'y a pas eu d'essais thérapeutiques chez l'homme utilisant les anticorps anti-FT ou anti-FVII. Les essais d'anticorps anti-endotoxine ont été décevants et très controversés (249-250).

II-3 Modulation pharmacologique de l'expression du FT

De nombreux travaux ont permis de déterminer les propriétés modulatrices de différents agents vis-à-vis de l'expression du FT par les monocytes.

La plupart des corticoïdes inhibent l'activité FT induite par l'endotoxine, les complexes immuns et par les fragments d'activation du complément (251). Cependant, la dexaméthasone augmente l'effet de l'endotoxine sur l'expression du FT par les monocytes (252).

La cyclosporine A semble réguler l'expression du FT, mais les données sont divergentes. Certaines études montrent un effet biphasique conduisant à une augmentation de l'activité FT par les monocytes (46,253), d'autres montrent une inhibition par la cyclosporine A en agissant sur les lymphocytes T (254), ou une inhibition directe et indépendante de la présence des lymphocytes T (255).

Les rétinoïdes inhibent l'expression du FT par les monocytes lorsque l'activité de la lipoxygénase est normale (256). Ils réduisent la formation de thrombus à la surface de monocytes adhérents dans des conditions normales de flux (257).

Les agents augmentant le taux d'AMP cyclique intracellulaire, comme la pentoxifylline diminuent l'expression fonctionnelle du FT par les monocytes en diminuant la transcription du gène (258). Les inhibiteurs des protéines kinases diminuent aussi l'expression du FT (259).

L'aspirine peut inhiber l'activation transcriptionnelle du FT dans les monocytes humains stimulés (260-261), alors que d'autres anti-inflammatoires n'ont aucun effet (260). Cette inhibition se situe au niveau de la translocation des protéines de la famille NFκB/c-Rel devant se fixer au site de liaison NFκB du gène du FT.

L'Iloprost® inhibe l'expression du FT (262). La desmopressine, quant à elle, augmente l'expression de FT dans la matrice extracellulaire synthétisée par des cellules endothéliales humaines in vitro et favorise donc l'adhésion plaquettaire (263).

Les vastatines, agents hypolipémiants, inhibent in vitro l'expression de FT dans les macrophages humains et les monocytes adhérents par un mécanisme impliquant l'induction du gène du FT (264).

Certains antioxydants comme le curcumin ou le glutathion (par l'intermédiaire de son précurseur la N-acétyl cystéine) inhibent l'expression de FT par un mécanisme d'action différent. Le curcumin intervient au niveau de la transcription du gène du FT (265), alors que la N-acétyl cystéine agit au niveau posttranscriptionnel (266).

III IMPLICATION DU FT DANS D'AUTRES PATHOLOGIES

III-1 Pathologie cancéreuse

Le cancer est connu pour être associé à des manifestations thrombotiques conduisant à l'activation de la coagulation et au dépôt de fibrine localisé aux sites tumoraux. La pathogénie

de cette hypercoagulabilité est complexe, mais l'expression du FT par les cellules malignes et les cellules de l'hôte y joue probablement un rôle. Les cellules tumorales intactes et les vésicules émises par ces cellules expriment une activité procoagulante ce qui favoriserait la dissémination systémique de la coagulation (267-268). Dans certaines tumeurs solides, les cellules malignes expriment également du FT (269). Les cellules hôtes, telles que les monocytes ou les cellules endothéliales, peuvent aussi exprimer du FT en réponse à la stimulation par les cellules tumorales (270).

Le FT exprimé par les cellules de l'hôte pourrait jouer un rôle important dans l'activation de la coagulation et la survenue de thromboses au cours du cancer (271).

III-2 Autres pathologies

En pathologie autoimmune de type lupus érythémateux disséminé, l'expression monocyttaire du FT est augmentée (272-273).

L'augmentation d'expression du FT par les monocytes sanguins est également retrouvée dans différentes pathologies inflammatoires telles que la Fièvre Familiale Méditerranéenne (274), la maladie de Crohn (275) ou après chirurgie générale (276), chirurgie orthopédique (277) ou cancéreuse (278).

Pour être actif, le FT doit être présent au sein d'une micelle lipidique au niveau des membranes cellulaires. L'expression du FT peut donc être modifiée en pathologie du métabolisme lipidique. In vitro, les VLDL, les IDL, les HDL favorisent l'augmentation de l'activité procoagulante des monocytes (279). Les LDL oxydées entraînent également une augmentation de l'expression de FT des monocytes (53), des macrophages (26,52) et des cellules endothéliales (280). In vivo, des modifications diététiques par un enrichissement en acides gras saturés diminuent l'expression du FT par les monocytes (281).

Le FT semble également jouer un rôle important dans les complications vasculaires liées au diabète. Chez des patients diabétiques déséquilibrés, les monocytes circulants possèdent une activité procoagulante élevée (282). Chez des patients non insulino-dépendants, les taux de FVIIa sont très importants suggérant une activation de la coagulation par l'intermédiaire du FT (283). Chez les patients insulino-dépendants, les monocytes expriment une forte activité FT (284).

Au total, ces dernières années, de nombreuses études ont porté sur l'expression du FT par les monocytes sanguins dans différentes pathologies. Elles confirment l'existence de modifications de cette expression pouvant intervenir dans l'initiation de la coagulation et conduire à la formation de fibrine.

Nous avons mené un travail expérimental qui visait à reproduire différentes situations en pathologie vasculaire où le FT est potentiellement impliqué. Le modèle expérimental choisi a été le lapin, avec ou sans induction d'une athérosclérose. Ce modèle nous a permis de suivre la modulation de l'expression du FT par différents agents potentiellement modulateurs. Notre attention s'est ensuite concentrée sur des drogues déjà utilisées en pathologie vasculaire sur des bases physiologiques qui n'avaient à priori pas de relation avec la régulation de l'hémostase en émettant l'hypothèse que certains agents utilisés en pathologie cardiovasculaire pouvaient moduler la voie du FT.

2^{ème} PARTIE :

Matériels et Méthodes

I INTRODUCTION

Les études in vivo permettent de comparer et d'adapter chez l'homme des résultats obtenus chez l'animal. Elles suscitent donc un intérêt clinique et thérapeutique. Cependant le choix d'un animal dépend de nombreux facteurs tels que la pertinence du modèle, la faisabilité technique du protocole, et son coût.

Le modèle choisi est le lapin mâle New Zealand (Charles River, France) de poids moyen 3 à 3,5 kg. Le lapin a de nombreux avantages en tant que modèle animal : il est peu onéreux ; les prélèvements sanguins sont facilement réalisables (accès facile à une artère et volume sanguin suffisant (130 ml environ) ; les vaisseaux du lapin sont de taille suffisante pour réaliser facilement les dénudations endothéliales et les techniques d'angioplastie et fournissent assez de matériel pour nos études histologiques.

Peu de travaux ayant été publiés en ce qui concerne l'hémostase du lapin, nous avons tout d'abord réalisé la mesure des paramètres de cytologie et de coagulation. Ceci nous a permis d'obtenir des données de base précises sur l'hématologie du lapin et d'établir des normes chez cette espèce. Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur des lapins normaux en bonne santé avant toute intervention expérimentale.

Nous avons ensuite testé l'effet du basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) et de la L-arginine sur un modèle de lésion associée à un régime hypercholestérolémique chez le lapin. En effet, il a été démontré pour chacun de ces produits un effet bénéfique sur les complications de l'athérosclérose, mais leur mécanisme d'action est encore mal connu et est peut-être plus complexe que celui qui avait été envisagé initialement.

I-1 La L-arginine

Le monoxyde d'azote (NO) est un important facteur de régulation vasculaire à travers ces propriétés vasodilatatrices (285), antiathérogéniques (286) et antithrombotiques. Le

mécanisme suggéré de l'action antithrombotique du NO est une inhibition de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire (287). De plus, il module la prolifération et la migration des CMLs (288). Le NO limite l'activation des cellules endothéliales (289-290). Il module in vitro l'expression de la protéine d'adhésion MCP-1 en diminuant la fixation du facteur de transcription NF- κ b (291), facteur qui intervient également dans la régulation du gène du FT (9).

L'hypercholestérolémie diminue les taux de NO (292). Cependant un traitement à la L-arginine, qui est le précurseur du NO, limite la progression de l'athérosclérose (286,293), restaure la vasodilatation dépendante de l'endothélium (294-295) et limite la prolifération des CMLs dans l'intima après angioplastie (295-296). De plus, la L-arginine diminue l'adhésion des monocytes sur l'endothélium en inhibant la transcription des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, MCP-1) (297).

Nous avons utilisé un modèle de lésion bilatérale associé à un régime enrichi en cholestérol chez le lapin afin de déterminer l'effet du contact entre une plaque rompue après angioplastie et le sang circulant sur l'expression de FT. Dans ce modèle, nous avons étudié l'effet de la L-arginine sur l'expression de FT par les monocytes sanguins.

I-2 Le bFGF

Il semble que les facteurs de croissance soient des agents thérapeutiques potentiels dans le traitement des complications ischémiques survenant au cours du processus d'athérosclérose. Ils induisent la prolifération et la migration des cellules endothéliales et jouent un rôle important dans le processus d'angiogénèse en réponse à l'ischémie. Ils participent également à la restauration de l'endothélium après traumatisme (298).

In vitro et in vivo, le bFGF peut stimuler la prolifération, les changements morphologiques et la migration des CMLs et des cellules endothéliales (299-300). Il participe à la réendothélialisation fonctionnelle du vaisseau après agression par ballonnet ou après

induction de l'athérosclérose (301-302). Cependant, les effets de l'administration de bFGF ne sont pas totalement connus. De nombreux gènes peuvent être activés par des facteurs de croissance en particulier le gène du FT par l'intermédiaire du site de fixation SRR (Serum Responsive Region) présent au sein du promoteur (**figure 9**) (9). En effet, il a été démontré une augmentation du taux d'ARNm de FT dans des fibroblastes humains et des CMLs de rat stimulés par certains facteurs de croissance (PDGF, FGF, TGF- β et EGF) (29,156,303-304).

Le but de notre étude a été de déterminer, dans un modèle de lapin hypercholestérolémique, si le bFGF injecté *in vivo* pouvait augmenter l'expression de FT dans les monocytes sanguins et dans la paroi vasculaire.

Enfin, nous avons étudié l'effet à moyen terme de l'injection d'une faible dose d'endotoxine chez le lapin afin de déterminer les effets à distance d'une infection bactérienne non létale.

II TECHNIQUES D'ANALYSE

Chaque animal est placé dans une cage individuelle et reçoit de l'eau ainsi que de la nourriture standard *ad libitum* sauf dans le cadre de protocoles particuliers. La température ambiante est comprise entre 15 et 20°C. Une alternance jour/nuit de 12 heures est assurée. Les animaux, sous surveillance régulière, étaient en bonne condition physique, ne montraient aucune maladie particulière et ne présentaient pas de perte de poids. Les lapins se sont habitués à leur environnement avant toute expérimentation.

Ces études ont respecté les recommandations internationales concernant les animaux d'expérimentation.

II-1 Prélèvements sanguins

Les animaux sont prélevés de façon stérile sur tubes de verre siliconés (Vacutainer, Becton Dickinson) par ponction artérielle au niveau de l'oreille, préalablement rasée et désinfectée à la bétadine (Asta Medica). De la xylocaïne 5% (nébuliseur, Astra) est pulvérisée au niveau de l'artère ce qui provoque une hyperémie et donc facilite les prélèvements. Pour minimiser le traumatisme de l'oreille, ces prélèvements ont été effectués alternativement entre les deux oreilles. Tous les prélèvements ont été pratiqués dans la matinée.

- ◆ 5 ml de sang sont prélevés sur héparinate de lithium (143 unités USP) afin de réaliser l'isolement des cellules mononucléées.
- ◆ 2 ml de sang sont prélevés sur citrate trisodique (1/10 volume de citrate trisodique 3,8%) pour l'étude de la coagulation sur plasma pauvre en plaquettes après centrifugation 15 minutes à 1500g à +4°C. Les échantillons de plasma (500µl) sont ensuite congelés à -80°C en attendant la réalisation des dosages.
- ◆ 1 ml de sang sont prélevés sur EDTA pour l'analyse hématologique à l'aide d'un compteur Coulter MAXM. La numération sanguine est vérifiée par comptage en Cellule de Malassez. La formule est réalisée sur frottis coloré au May Grünwald Giemsa (MGG). Chaque comptage est effectué par trois personnes n'ayant pas pris connaissance du traitement alloué.

II-2 Isolement des cellules mononucléées

L'isolement des cellules mononucléées a été réalisé selon la méthode de Boyum. Au préalable, tous les réactifs, stériles et apyrogènes, sont remis à température ambiante. Les manipulations se font sous hotte à flux laminaire vertical.

Le sang hépariné est mélangé à une solution de RPMI 1640 additionnée d'HEPES (Gibco) de façon à obtenir un rapport de 1 pour 2 (v/v), puis déposé délicatement sur une solution de

diatrizoate de sodium-Ficoll (milieu de séparation des lymphocytes, MSL, $d=1,077 \pm 0,0001$, Eurobio) dans un tube de polypropylène (type 2001 Falcon, Becton Dickinson) avec un rapport de 3/2 (vol. sang dilué en RPMI/vol. Ficoll).

Les tubes sont ensuite centrifugés à température ambiante, à 400g, pendant 40 minutes. L'anneau de cellules mononucléées est récupéré à l'interface MSL/RPMI 1640. Les cellules sont lavées deux fois dans du RPMI auquel a été ajouté de la L-Glutamine (29,2 mg/ml, Gibco), par centrifugation 10 minutes, à 400g, à température ambiante. Les cellules sont alors comptées en Cellule de Malassez pour permettre d'ajuster la concentration cellulaire à 3×10^6 cellules/ml de RPMI additionné de L-Glutamine mais sans sérum de veau foetal. Le rendement d'isolement des cellules était en moyenne de $19 \pm 1\%$ (8-48%).

Les suspensions cellulaires sont réparties dans des tubes de polypropylène (type 2063 Falcon-12x75 mm) à raison de 500 μ l par tube soit $1,5 \times 10^6$ cellules par tube. Une partie des cellules fraîchement isolées est directement congelée à -80°C avant la mise en culture et vont correspondre aux cellules non incubées (NI). Les autres échantillons de préparations cellulaires sont cultivés pendant 16 heures à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2 , sans (cellules I) ou avec stimulation par l'endotoxine (*E coli* 055:B55, Sigma) à raison de 1 μ g/ml soit 5000 EU/ml (cellules I+E).

La viabilité cellulaire est supérieure à 98% (test au bleu Trypan, RAL, France).

A la fin de la période d'incubation, les cellules mononucléées sont remises en suspension puis immédiatement congelées à -80°C .

II-3 Préparation des étalements cellulaires

Après la période d'incubation, une partie des suspensions cellulaires (I, I+E) est ajustée à $7,5 \times 10^5$ cellules/ml par dilution dans de l'eau physiologique. Les lames sont préparées par dépôt de 100 μ l de suspension cellulaire soit $7,5 \times 10^4$ cellules/ml dans les puits d'une

cyto centrifugeuse (700 tours/minute pendant 3 minutes). Les lames sont ensuite séchées à l'air libre 24 heures avant d'être emballées dans du papier aluminium et congelées à -20°C .

Un contrôle de qualité de la suspension cellulaire (proportion et morphologie des cellules) est réalisé sur une lame colorée au MGG. Les suspensions cellulaires sont constituées en moyenne de 70% de lymphocytes et de 12% de monocytes. La contamination granulocytaire est de 18%.

II-4 Méthodes fonctionnelles du dosage du FT

II-4-1 Techniques de lyse cellulaire

Après décongélation, la destruction des membranes cellulaires est poursuivie par addition d'un tampon de lyse. Carson a récemment démontré que l'activité FT de cellules lysées variait en fonction du détergent utilisé et en fonction de sa concentration (305). La comparaison a donc été faite entre deux méthodes :

soit addition de 60 μl d'un tampon de lyse constitué de 0,05 M Tris/HCl ; 0,1 M NaCl ; 0,1% Triton X100 ; 0,1% SAB pendant 30 minutes à 37°C associée à une série de mélanges vigoureux au Vortex ;

soit, addition de 15 μl de N octyl β D glucopyranoside ou NOG (Sigma) à 16 mM en tampon Hépès Saline (NaCl 0,9/1000 tamponné avec hépès 25 mM) pour 100 μl de suspension cellulaire. Après un mélange vigoureux au Vortex, la suspension est placée à 37°C pendant 15 minutes puis placée dans la glace avant d'effectuer rapidement la mesure du FT.

Ces deux techniques de lyse donnent des résultats similaires. Cependant, notre choix s'est porté sur le NOG qui donne globalement une meilleure réponse que le Triton (305).

II-4-2 Méthode amidolytique

La technique utilisée est dérivée des méthodes de Carson puis de Surprenant que nous avons adaptées à nos suspensions cellulaires.(306-307)

II-4-2-1 Principe

Le principe du dosage du FT par cette technique est une mesure de la génération de facteur X activé en présence de FT, de facteur VII et de facteur X. Le dosage est réalisé par colorimétrie en utilisant un substrat chromogène spécifique du facteur X activé. Si dans le milieu de dosage, les autres facteurs nécessaires à la génération de Xa sont en excès, la vitesse de génération de facteur Xa est dépendante de la concentration en FT, le FT étant le facteur limitant de la réaction.

II-4-2-2 Choix des facteurs VII et X

Le choix des facteurs VII et X a été à l'origine d'une comparaison entre deux sources différentes de ces facteurs :

1) le PPSB (Laboratoire de Fractionnement et des Biotechnologies, France) ne contient pas de phospholipides mais est composé de :

- ◆ facteur II : 30 à 45 UI/ml
- ◆ facteur VII : 20 à 35 UI/ml
- ◆ facteur IX : 25 UI/ml
- ◆ facteur X : 30 à 50 UI/ml

dilué de façon à mettre en excès les facteurs VII et X soit compris entre 3 et 6 UI/ml.

2) Les facteurs VII et X purifiés (Stago) dilués au quart pour obtenir une concentration de 50 nM et 450 nM respectivement.

La source de facteurs VII et X retenue est le PPSB car l'évaluation de l'activité Xa est très semblable dans les deux cas. De plus, ce choix a été fait pour des raisons fortement économiques.

L'étalonnage a été réalisé à partir de thromboplastine de cerveau de lapin disponible commercialement (CI+, Stago).

Le substrat chromogène utilisé est le S 2765 (Chromogenix), reconstitué dans de l'eau distillée pour obtenir une concentration finale de 500 µg/ml dans le milieu réactionnel.

La lecture a été faite par une mesure de densité optique (DO) à 405 nm sur Twin Reader (Flow), qui enregistre la cinétique de la réaction par une mesure de variations de DO (Δ DO) durant 6 secondes toutes les minutes.

II-4-2-3 Procédure

Les tests sont réalisés de la façon suivante : 50 µl de thromboplastine diluée ou de lysat cellulaire à tester sont incubés dans une microplaque pendant 2 minutes, puis sont mélangés avec 50 µl de CaCl₂ 0,25 M (3 minutes d'incubation), et mélangés enfin avec 50 µl de PPSB dilué au quart (incubation 3 minutes). Après addition de 50 µl du substrat chromogène S 2765, la lecture de Δ DO/min (variation de DO par minute) est réalisée aux temps T₀, T+1, T+2 et T+3 minutes.

Arbitrairement, la valeur de 1000 U de FT a été attribuée à 1 ml de thromboplastine de lapin pure.

Des dilutions en tampon Owren de la thromboplastine de lapin a permis d'obtenir une courbe d'étalonnage comportant en abscisse, en coordonnées bilogarithmiques, les dilutions de thromboplastine (de 1 à 10⁻⁵) et en ordonnée les Δ DO. La courbe obtenue est linéaire avec une pente constante pour les dilutions du 1/10 au 1/1000 (1000 à 10 mU de FT) définissant la zone de linéarité de la technique. La lecture à T₀ a permis de détecter une activité Xa importante des suspensions cellulaires et a permis la lecture de la gamme d'étalonnage. T+3min a fourni la Δ DO/min maximum des suspensions cellulaires. Les Δ DO/min observées sont ensuite reportées sur la droite d'étalonnage et converties en mU de FT/10³ monocytes.

Les suspensions cellulaires sont tout d'abord testées pures, puis diluées si la $\Delta DO/min$ excède les limites de la linéarité de la technique.

II-4-3 Test de neutralisation par un anticorps anti-FT

Ces tests ont utilisé un anticorps monoclonal de souris anti-FT de lapin (AP-1, don du Pr. M.D. Ezekowitz, New Haven , Connecticut, USA). La neutralisation de l'activité FT des cellules a été déterminée par un test de coagulation en un temps selon la procédure suivante : 50 μl d'anticorps dilué au 1/18 dans du tampon Owren est incubé pendant 30 minutes à 37°C avec 50 μl de thromboplastine de lapin ou 50 μl de lysat cellulaire à tester. Après addition de 50 μl de plasma de lapins normaux (plasma témoin) et de 50 μl de $CaCl_2$ 0,25 M (déclenchement de la réaction), la lecture du temps de coagulation est réalisée sur un automate STA (Stago). Dans ce système, le temps de coagulation du plasma témoin + tampon Owren est de 213 secondes. Le pourcentage de neutralisation est calculé en utilisant l'activité du FT de lapin pur, sans et avec anticorps anti-FT comme 0% (65 secondes) et 100% (213 secondes).

Afin de vérifier la spécificité de l'anticorps utilisé, des anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-FT humains (HTF1 de Carson, Ac anti-FT de Morrissey, Ac type 2 recombinant (Calbiochem), Ac 4508 (American Diagnostica) ont été testés à la fois sur de la thromboplastine humaine (thromborel S Behring) et sur de la thromboplastine de lapin. La procédure est la même que celle décrite auparavant. Chaque anticorps a été testé à plusieurs dilutions sur deux dilutions de thromboplastine qui correspondent respectivement à un temps de coagulation de 25 et 35 secondes. Aucun de ces anticorps testés n'avait de spécificité pour l'antigène FT de lapin. De même, l'anticorps AP-1 ne possède pas de spécificité pour le FT humain.

II-5 Méthodes immunologiques de détection du FT

L'immunomarquage monocyttaire a été révélé par technique APAAP, technique principalement utilisée au Laboratoire. L'immunomarquage tissulaire a été révélé par technique ABC peroxydase que nous avons mise au point d'après la méthode utilisée par Pawashe et al., équipe ayant purifié l'anticorps anti-FT de lapin que nous utilisons (197).

II-5-1 Immunocytochimie par technique APAAP

Il s'agit d'un immunomarquage indirect du FT réalisé sur des cytocentrifugations, dans lequel la révélation utilise le complexe Phosphatase Alcaline, introduite comme enzyme d'immunomarquage par Avraméas (1969) et couplé à l'Antiphosphatase Alcaline. Elle se déroule en quatre étapes principales :

- 1) fixation de l'anticorps monoclonal sur l'antigène à mettre en évidence (anticorps primaire).
- 2) fixation d'une immunoglobuline biotinylée sur l'anticorps primaire (anticorps secondaire dirigé contre l'espèce ayant servi à fabriquer l'anticorps monoclonal).
- 3) fixation du complexe APAAP
- 4) révélation de l'activité Phosphatase Alcaline par un substrat chromogène.

Le matériel utilisé pour cette technique est le coffret APAAP System Kit Monoclonal Universal Mouse (Dako).

Pour l'immunomarquage monocyttaire, il est nécessaire de pratiquer une étape de saturation par du sérum des récepteurs Fc, source de fixations non spécifiques (faux positifs). Pour s'assurer de l'absence de coréactivité avec les produits de révélation utilisés, une lame témoin est réalisée sans application de l'anticorps primaire.

Anticorps monoclonaux utilisés

Ce sont des anticorps murins d'isotype IgG1. Ils sont utilisés dilués dans du TBS-Tween + 10% de sérum de lapin + 1% de sérum de chèvre.

- anticorps anti-FT (AP-1, Pr Ezekowitz)
- anticorps de contrôle : anticorps murin d'isotype IgG1 (Mouse IgG1 negative control, Dako)

L'anticorps anti-FT est utilisé à la dilution 1/450 soit 1 µg/ml car cette dilution nous donne un contraste franc entre cellules positives et négatives. L'anticorps de contrôle, n'ayant pas de spécificité avec le lapin, est utilisé à la même dilution afin de vérifier la spécificité des marquages observés ainsi que l'efficacité de l'inhibition des peroxydases endogènes. Cet anticorps est appliqué sur des cellules stimulées et non stimulées.

II-5-1-1 Réactifs

Le tampon de lavage et de dilution est le tampon Tris Buffer Saline (TBS) additionné de 0,02% de Tween 20 à pH 7,2 préparé extemporanément. L'inhibition de l'activité peroxydasique endogène est assurée par du lévamisole contenu dans le substrat, le naphthol phosphate + Fast Red préparé extemporanément par dilution dans 2 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 8,2.

II-5-1-2 Procédure

L'immunocytochimie des cellules non stimulées et des cellules stimulées d'un même animal est réalisée au cours de la même manipulation. Les lames à marquer sont sorties du congélateur le jour de la technique et laissées à température ambiante au moins 30 minutes dans leur emballage afin d'éviter toute condensation au contact direct des cellules ce qui provoquerait une lyse cellulaire. Tout d'abord, les préparations sont fixées afin de préserver la morphologie des cellules sans altérer l'antigénicité. La technique de fixation est la suivante : les lames sont plongées 2 minutes dans de l'acétone tamponnée à 10% dans du TBS, puis 2 minutes dans de l'acétone pure, et enfin 2 minutes dans du paraformaldéhyde à 4% à pH 7,4.

Après 3 rinçages successifs de 5 minutes dans du tampon TBS-Tween, les lames sont séchées à l'air libre 15 minutes. Elles sont ensuite réhydratées dans du tampon TBS-Tween 5 minutes puis installées sur un appareil d'incubation en chambre humide (Séquenza, Shandon). Le sérum bloquant (10% sérum de lapin + 1% sérum de chèvre dans du TBS-Tween) est déposé et laissé en contact 30 minutes. Les 4 étapes de l'immunomarquage sont ensuite réalisées selon la technique préconisée par le fabricant. Après rinçage et séchage, les lames sont contre-colorées 3 minutes à l'Hématoxyline de Mayer (Sigma). Après montage d'une lamelle, les lames sont lues au microscope optique.

II-5-1-3 Lecture des lames

La positivité monocytaire apparaît sous la forme d'une coloration rouge vif du cytoplasme accompagnée ou non d'un renforcement membranaire. Seuls les monocytes sont marqués. Cette positivité est d'intensité variable selon les cellules sur une même lame et selon les animaux au sein d'une même manipulation. On peut ainsi différencier les monocytes négatifs, positifs, et fortement positifs. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules marquées.

II-5-2 Immunocytochimie par technique ABC peroxydase

II-5-2-1 Principe

Il s'agit d'un immunomarquage indirect du FT réalisé sur des coupes d'artères, dans lequel la révélation utilise le complexe Avidine-Biotine couplé à la peroxydase de Raifort. Le principe est le même que celui décrit précédemment.

Le matériel utilisé pour cette technique est le coffret Vectastain Elite ABC peroxydase Kit (Vector).

L'anticorps anti-FT (AP-1) est utilisé à la dilution 1/300 soit 1,125 µg/ml. Cette concentration nous donne un contraste net vis-à-vis des zones négatives contrecolorées. La dilution de l'anticorps se fait dans du tampon Phosphate Buffer Saline (PBS).

Le PBS à pH 7,2 est préparé extemporanément. L'inhibition de l'activité peroxydasique endogène est assurée par une solution de perhydrol à 0,3%. Le substrat chromogène est préparé extemporanément à partir d'un volume égal de perhydrol à 0,03% en eau distillée et de D.A.B. (diaminobenzidine tetrachloride) en tampon TRIS 0,1 M.

II-5-2-2 Procédure

Les animaux sont anesthésiés au pentobarbital sodique (30 mg/kg, Sanofi). L'aorte abdominale et les artères iliaques sont rapidement isolées et prélevées. Après rinçage dans du sérum physiologique, les artères sont placées dans une solution cryoprotectrice de sucrose à 30% en eau distillée à température ambiante pendant 16 heures. Les vaisseaux sont alors enchassés dans du méthyl méthacrylate (OCT, 4583, Tissue-Tek) pour être rapidement congelées dans de l'isopentane froid. Les artères sont ensuite conservées à -80°C. Des coupes de 6 µm sur lames (Superfrost plus) sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Reichert Jung) et rapidement congelées à -80°C en attendant la réalisation de l'immunomarquage.

Après décongélation et séchage 10 minutes à l'air libre, les coupes sont plongées dans de l'acétone pendant 10 minutes. Cette étape de fixation permet de préserver la morphologie des tissus sans altérer l'antigénicité. Après séchage et réhydratation dans du tampon PBS, les coupes sont incubées avec du sérum bloquant à 20% (sérum normal de lapin, Dako) pendant 20 minutes. L'anticorps anti-FT est alors appliqué 1 heure à 37°C. Parallèlement, un contrôle négatif sans anticorps primaire est réalisé. Après rinçage dans du PBS, l'anticorps secondaire anti-souris biotinylé dilué dans du tampon PBS est appliqué 1 heure à température ambiante. Après 3 rinçages successifs de 30 minutes dans du PBS, les coupes sont incubées pendant 1 heure avec la solution d'avidine-biotine peroxydase. L'activité peroxydasique est révélée par

un chromogène constitué de D.A.B. additionné de peroxide d'hydrogène dilué dans du PBS. Après rinçage et séchage, les coupes sont contre-colorées 1 minute 30 à l'Hématoxyline de Mayer. Après montage d'une lamelle, les lames sont lues au microscope optique.

La positivité tissulaire apparaît sous la forme d'une coloration brunâtre.

II-6 Contrôles de stérilité et d'apyrogénicité

II-6-1 Controles de stérilité

L'absence de germes a été vérifiée par examen direct sur toutes les suspensions cellulaires, et un échantillon de chaque série a été contrôlé par culture en cas de doute à l'examen direct sur les premières manipulations. Ces tests ont permis de démontrer que le virage au jaune de l'indicateur coloré de pH était un indicateur fiable de contamination. Ultérieurement, les cultures dont l'indicateur coloré avait viré ont systématiquement été écartées.

II-6-2 Controles d'apyrogénicité

Ces contrôles ont été réalisés par le test au Limulus Chromogénique (Chromogenix) selon un protocole dont la sensibilité est de 0,03 EU/ml. Ces tests ont été réalisés grâce à l'aide du Laboratoire de Contrôle de Qualité du Centre Régional de Transfusion de Lille (Dr Benoît Flan).

II-7 Dosages des facteurs plasmatiques

Les échantillons de plasma, qui étaient conservés à -80°C , ont été utilisés pour doser les différents facteurs de la coagulation : facteur II (FII), facteur V (FV), les facteurs VII+X (FVII+X), le taux de prothrombine (encore appelé temps de Quick), et le taux de fibrinogène (Fb). Le plasma témoin de référence correspond à un mélange de plasmas de lapins normaux. Les dilutions s'effectuent dans du tampon Owren Koller.

II-7-1 Dosage du taux de prothrombine

Le taux de prothrombine (TP) ou temps de Quick mesure globalement l'activité des facteurs de la coagulation extrinsèque: F II, V, VII, et X. Il est déterminé en présence de thromboplastine calcique et est exprimé en pourcentage.

Le dosage est effectué de la manière suivante : 50 µl de plasma témoin ou 50 µl de plasma à étudier sont incubés à 37°C pendant 2 minutes. Après déclenchement de la réaction par addition de 100 µl de thromboplastine de lapin, la lecture du temps de coagulation est réalisée sur STA. Les valeurs obtenues sont reportées sur une droite d'étalonnage réalisée à partir de dilutions standards du plasma témoin (de pur au 1/4) correspondant à un pourcentage d'activité (pur=100% d'activité, 1/4=25% d'activité).

II-7-2 Dosage des facteurs II, V et VII+X

Ce dosage des facteurs du complexe prothrombinique est un test complémentaire du taux de prothrombine pour l'exploration de la voie extrinsèque de la coagulation. Il consiste à mesurer le temps de coagulation en présence de thromboplastine calcique dans un système où tous les facteurs (FII, FV, FVII+X) sont présents en excès à l'exception du facteur à étudier (FII, FV, ou FVII+X) qui sera apporté par le plasma à tester.

En pratique, 50 µl de plasma à étudier (dilué au 1/10) sont mélangés à 50 µl de plasma déficient en un facteur (Stago). Après incubation 4 minutes à 37°C, la réaction est déclenchée par addition de 100 µl de thromboplastine CI+. Le temps de coagulation mesuré est reporté sur une droite d'étalonnage tracée à partir de dilutions du plasma témoin (1/10 au 1/40) correspondant à un pourcentage d'activité (100% à 25% respectivement). Pour le dosage du FV, la courbe d'étalonnage est réalisée à partir de dilutions plus importantes (1/100 au 1/400), le plasma à étudier est dilué au 1/100.

II-7-3 Dosage du taux de fibrinogène

Le taux de fibrinogène est mesuré selon la technique de Clauss. En présence d'un excès de thrombine, le temps de coagulation d'un plasma dilué dans des proportions adéquates est proportionnel au taux de fibrinogène du plasma étudié.

La détermination quantitative du fibrinogène est réalisée de la façon suivante : 50 µl de plasma humain de référence (Biomérieux) ou 50 µl de plasma à étudier (dilution au 1/20) sont incubés à 37°C pendant 2 minutes. Après déclenchement de la réaction par addition de 50 µl de thrombine calcique (Biomérieux), la lecture du temps de coagulation est réalisée sur STA (Stago). Les valeurs obtenues sont reportées sur une droite d'étalonnage réalisée à partir de dilutions d'un plasma humain de référence dont le taux de fibrinogène est à 3 g/l.

II-8 Etudes histologiques

Après anesthésie des animaux au pentobarbital sodique (30 mg/kg), un cathéter est introduit dans l'aorte abdominale. Une solution de fixation au paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans du PBS est perfusée sous une pression de 110 mm Hg pendant 15 minutes. Cette fixation *in situ* permet de préserver les dimensions naturelles des vaisseaux. Après isolement et prélèvement, l'aorte abdominale et les artères iliaques sont maintenues dans du PFA à 4% durant 24 heures. Les artères sont ensuite découpées en échantillons de 3 à 5 centimètres pour l'étude morphologique.

Après déshydratation dans l'alcool et le xylène, les échantillons sont enchassés dans de la paraffine. Des coupes de 4 µm sont déposées sur lames Superfrost Plus. Elles sont ensuite déparaffinées dans le toluène puis réhydratées dans l'alcool. Les coupes tissulaires sont alors colorées à l'orcéine qui permet de colorer l'élastine.

III MODELE EXPERIMENTAL

Le modèle de lésion artérielle peut être décomposé en plusieurs étapes :

III-1 Lésion unilatérale sans régime

III-1-1 Procédure

Les lapins sont anesthésiés par injection en intramusculaire d'un mélange de kétamine (0,5 ml/kg, Imalgène 1000, Biomérieux) et de xylazine (0,25 ml/kg, Rompun, Bayer). L'anesthésie est maintenue durant la durée de l'expérimentation par injection de kétamine et de xylazine par la veine marginale de l'oreille. Après exposition et artériotomie de l'artère fémorale superficielle, une sonde à ballonnet stérile de type Fogarty 3F (Baxter) est introduite par voie rétrograde jusqu'au carrefour aorto-iliaque distant de 10 cm. Le ballonnet est ensuite gonflé et retiré ce qui désendothélialise une partie de l'aorte abdominale et l'artère iliaque complète. Cette opération est répétée 3 fois pour réaliser une dénudation totale. L'artère fémorale est ensuite ligaturée et l'animal recousu après instillation locale de 250 mg d'amoxicilline (Augmentin, SmithKline Beecham).

Deux groupes de lapins sont étudiés :

des lapins avec une unique dénudation iliaque primitive gauche

un groupe de lapins contrôles. La procédure d'exposition de l'artère fémorale gauche est la même mais celle-ci n'est pas désendothélialisée mais immédiatement ligaturée de façon proximale et distale, puis l'animal est recousu.

Une cinétique de prélèvements sanguins est réalisée sur une durée totale de 28 jours. De plus, une évaluation macroscopique de la réendothélialisation est réalisée par technique du bleu Evans. L'hyperplasie néointimale est observée sur coupes tissulaires d'artères colorées à l'orcéine.

III-1-2 Evaluation de la réendothélialisation par technique du bleu Evans

Trente minutes avant anesthésie du lapin au pentobarbital sodique (30 mg/kg), 5 ml d'une solution de bleu Evans à 1% est injecté par voie veineuse. Après cervicotomie et exposition des deux artères carotides primitives, un cathéter est introduit dans chaque artère. Par l'un des cathéters est perfusée une solution de serum salé isotonique, l'autre cathéter sert à l'exsanguination. Lorsque le liquide sortant est clair, une laparotomie médiane est réalisée afin de prélever l'aorte abdominale ainsi que les deux artères iliaques. L'ensemble est soigneusement débarrassé des tissus péri-adventiciels avant d'être positionné et ouvert de façon longitudinale. Les zones réendothélialisées sont définies comme étant celles qui ne fixent pas le bleu Evans.

III-2 Lésion bilatérale sans régime

La procédure est la même que pour la lésion unilatérale. La différence dans ce groupe de lapins correspond à la dénudation des iliaques gauche et droite simultanément. Une cinétique de prélèvements sanguins est également réalisée sur une durée totale de 28 jours.

III-3 Induction d'une lésion par régime enrichi en cholestérol

III-3-1 Procédure

Chez l'éleveur, 6 lapins sont placés sous régime athérogène à 2% de cholestérol durant 6 semaines. Deux cents grammes de nourriture enrichie étaient attribués par jour et par lapin (Charles River, France). Deux jours après l'arrivée des lapins hypercholestérolémiques au laboratoire, les prélèvements sanguins sont réalisés.

III-3-2 Dosage des lipides totaux

Le cholestérol et les triglycérides totaux ont été mesurés par une technique enzymatique utilisant respectivement la cholestérol estérase + la cholestérol oxydase et la glycérol-3-phosphate oxydase (kit Boehringer) adaptée sur un automate Hitachi 747 (Japon).

Les dosages des lipides totaux, contrairement aux autres dosages plasmatiques, sont réalisés sur plasma frais.

III-4 Lésion bilatérale et régime enrichi en cholestérol

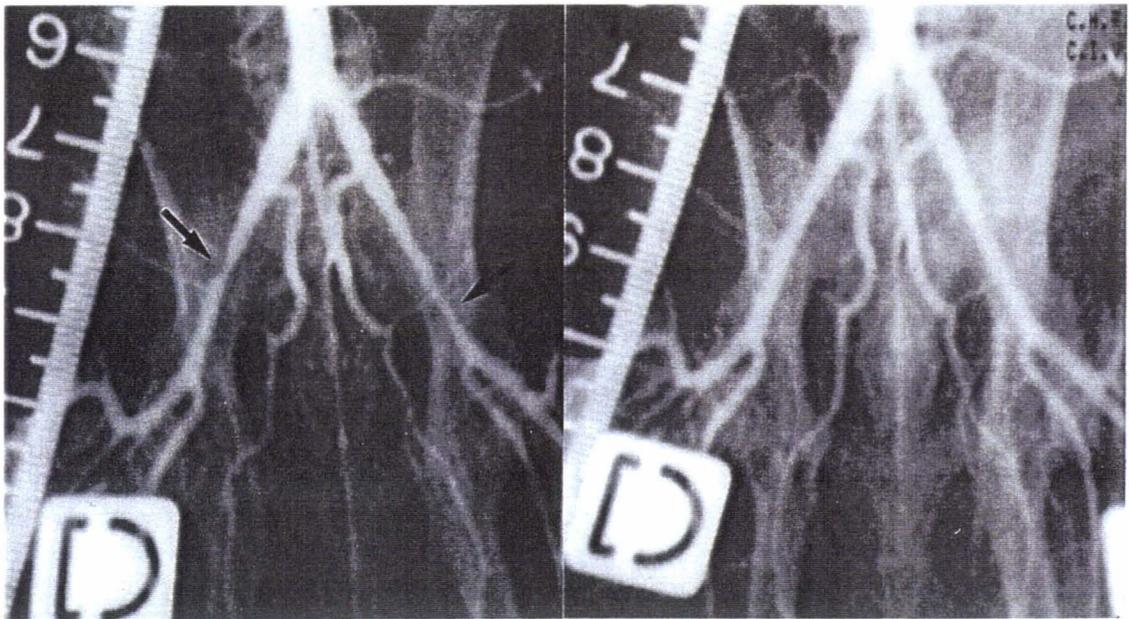
III-4-1 Procédure

Une dénudation des deux iliaques et de l'aorte abdominale est tout d'abord réalisée selon le protocole décrit précédemment. Les animaux sont anesthésiés par voie veineuse avec de l'éthyl carbamate (1 g/kg). Les lapins sont ensuite placés sous régime hypercholestérolémique à 2% de cholestérol pendant 6 semaines afin d'induire une athérosclérose iliaque bilatérale. Afin de confirmer l'existence d'une lésion au niveau des iliaques, une artériographie est pratiquée.

Les lapins ont été prélevés 3 semaines après la dénudation artérielle et la mise sous régime athérogène, et juste avant l'artériographie à 6 semaines.

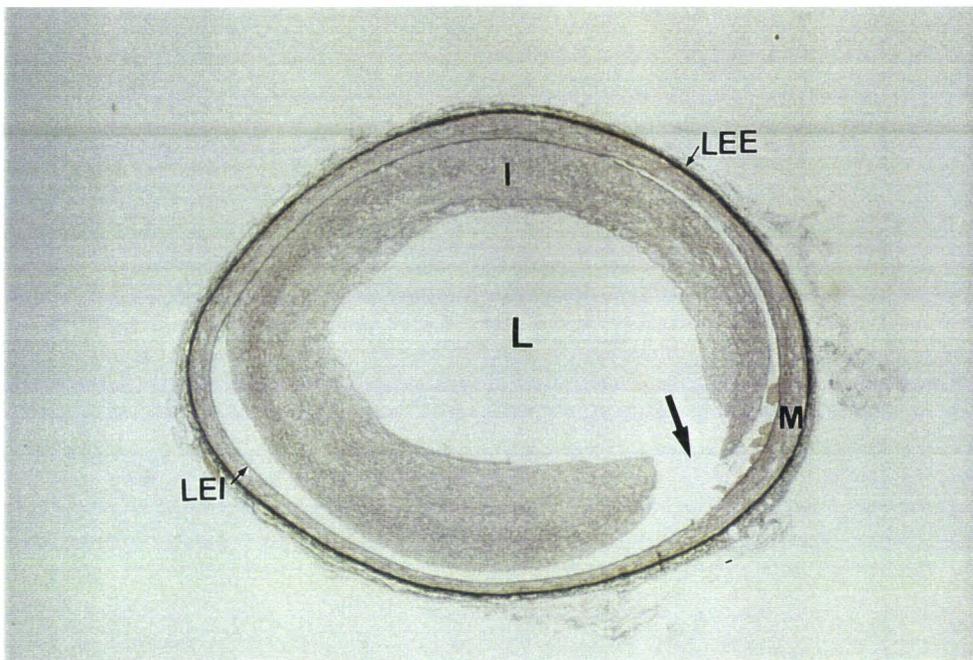
III-4-2 Artériographie

Les lapins sont anesthésiés à l'éthyl carbamate (1 g/kg). Après cervicotomie et exposition de l'artère carotide droite, un désilet 5F est introduit jusqu'au niveau du diaphragme c'est à dire à la jonction aorte thoracique-aorte abdominale. Trois minutes après l'injection intra-artérielle de 200 µg de dinitrate d'isosorbide, une artériographie iliaque est réalisée par injection manuelle de 3 ml de produit de contraste iodé (amidotrizoates de sodium et de méglumine, environ 1 ml/seconde) par un cathéter placé juste au dessus de la bifurcation iliaque (**figure 12**).



A

B



C

Figure 12 : Angiogrammes des artères iliaques avant (A) et immédiatement après (B) angioplastie.

La sténose qui a été dilatée est indiquée par les flèches.

Après angioplastie, la sténose est significativement diminuée.

C : Coupe histologique d'une artère iliaque après angioplastie colorée à l'orcéine Van-Gieson.

La flèche indique une dissection intimale. La lumière (L), l'intima (I), la limitante élastique externe (LEE), la média (M) et la limitante élastique interne (LEI) sont indiqués. X38

III-5 Effet de l'angioplastie

III-5-1 Procédure

Suite à l'artériographie à 6 semaines, une angioplastie iliaque est réalisée. Après cette opération, les lapins sont encore laissés 4 semaines sous régime hypercholestérolémique.

III-5-2 Angioplastie

Après injection d'héparine (100 UI/kg) une angioplastie iliaque est pratiquée lorsqu'une sténose est présente. La sténose est franchie à l'aide d'un guide, puis un ballon d'angioplastie de 2,5 mm de diamètre (Bard) est introduit par le désilet. Le ballon est gonflé à 6 atmosphères pendant une minute au site de la sténose. Cette manœuvre est répétée à trois reprises.

L'artériographie est renouvelée 5 minutes après la dernière inflation, 3 minutes après injection de 200 µg dinitrate d'isosorbide. Le désilet est ensuite retiré, la carotide ligaturée et l'incision suturée. Les lapins reçoivent ensuite 50 mg/kg d'amoxicilline en intramusculaire. Le succès de l'angioplastie est défini par une diminution du pourcentage de sténose $\geq 20\%$ (Figure 12).

III-6 Modulation pharmacologique

III-6-1 Effet de la L-arginine

III-6-1-1 Procédure

Dans le modèle de double lésion (dénudation bilatérale des iliaques, régime et angioplastie), les lapins sont laissés 4 semaines sous régime hypercholestérolémique et ont été séparés en deux groupes, l'un recevant de la L-arginine hydrochloride dans l'eau de boisson (Sigma), l'autre groupe ne recevant pas de traitement.

La dose de L-arginine (2,25% dans l'eau de boisson) a été choisie à partir de travaux antérieurs démontrant que cette dose est bien tolérée par les animaux et qu'elle conduit à une augmentation plasmatique significative du taux d'arginine par rapport aux animaux sans traitement (286).

Les lapins ont été prélevés 4 semaines après angioplastie.

III-6-1-2 Dosage de la L-arginine

Le taux de L-arginine est déterminé sur du plasma obtenu à partir de sang recueilli sur héparinate de lithium centrifugé à 1500g à +4°C pendant 15 minutes. Ce plasma frais est ensuite déprotéinisé avec de l'acide sulfosalicylique à 10%. Le dosage est ensuite effectué à l'aide d'un analyseur automatique d'acides aminés (modèle LC 300, Biotronic Instrument).

III-6-2 Effet du bFGF

Les lapins, préalablement placés sous régime hypercholestérolémique pendant 6 semaines et sans aucune agression par ballonnet, reçoivent 2 fois par semaine, par injection intraveineuse, du bFGF recombinant humain (2,5 µg de bFGF dans 1 ml de serum albumine de lapin à 0,5%, Sigma), ceci durant 3 semaines.

Parallèlement, un groupe de 6 lapins non hypercholestérolémiques sont traités de la même façon au bFGF. Le protocole employé est le même que celui cité précédemment.

Tous les animaux sont ensuite prélevés avant d'être sacrifiés. Parallèlement, une étude immunologique de détection du FT est réalisée sur coupes d'artères.

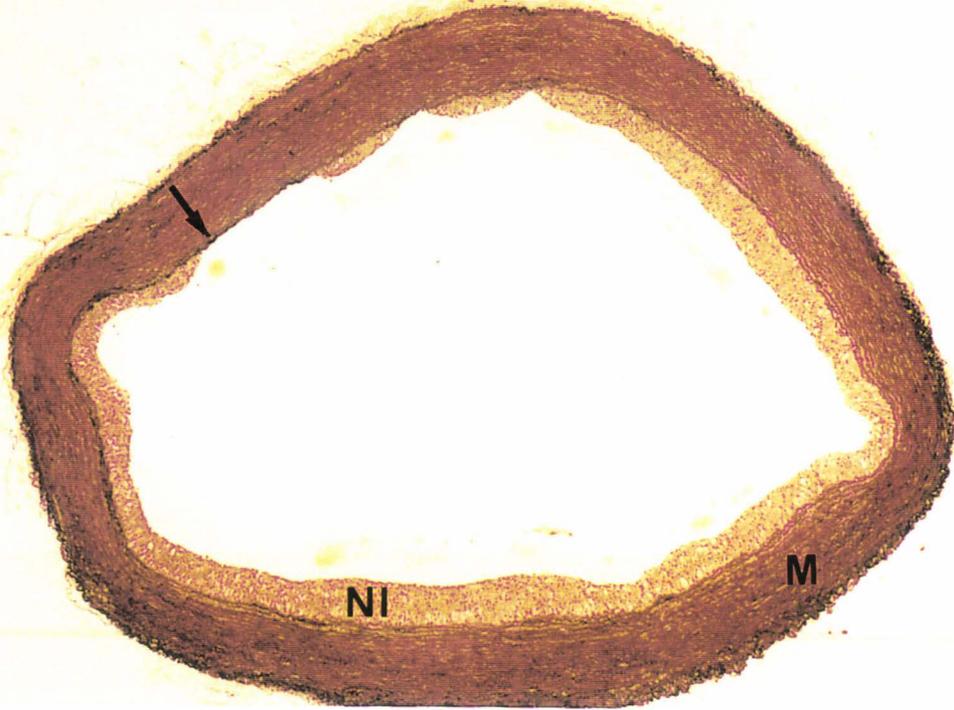
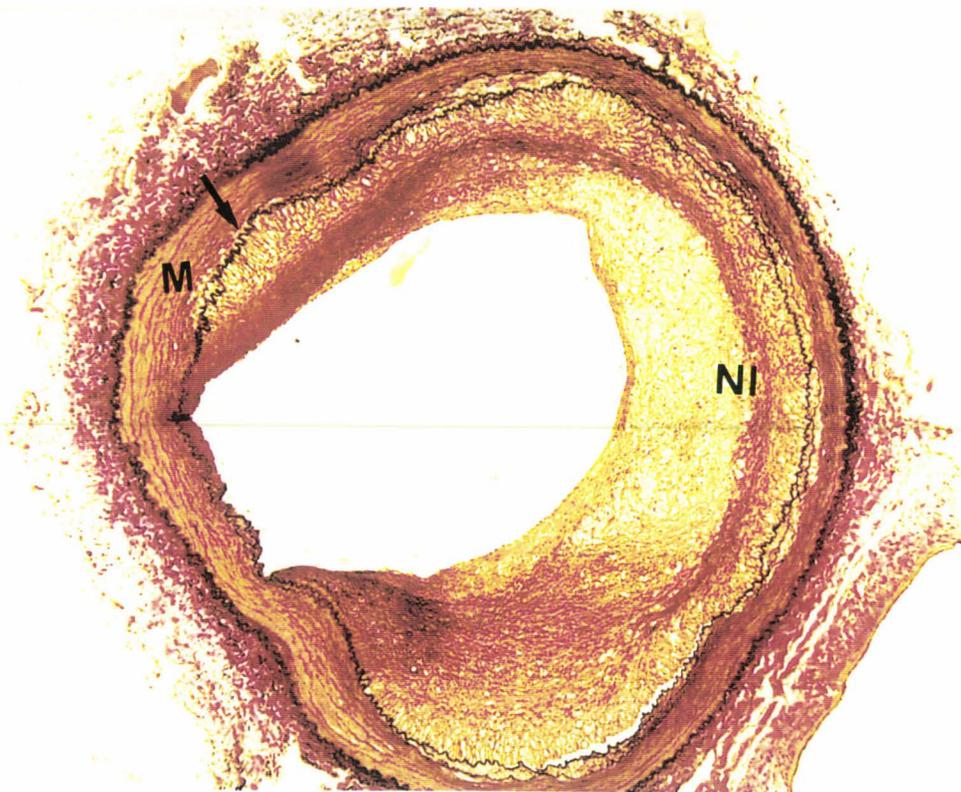
A

Figure 12 bis : Coupes histologiques d'artères après 6 semaines de régime enrichi en cholestérol (A) ou après double lésion associée à un régime enrichi en cholestérol (B). La flèche indique la limitante élastique interne. Média (M), néointima (NI). Coloration à l'orcéine Van-Gieson.

B

III-7 Effet de l'endotoxine

L'endotoxine (*Escherischia coli* 055:B5, Sigma) est injectée par la veine marginale de l'oreille à la dose de 0,5 mg/kg dans 3 ml de serum salé isotonique. Cette dose d'endotoxine a été choisie parce qu'elle induit un choc endotoxinique tout en permettant une survie suffisante des animaux pour réaliser une étude à moyen terme des effets de l'endotoxine. Tous les lapins ont été placés sous observation pendant les quatre premières heures de leur choc (aspect clinique et fréquence respiratoire). A 4 heures, un prélèvement sanguin a permis d'évaluer l'équilibre acido-basique (pH, PCO₂, PO₂, bicarbonates). Le poids des animaux a été relevé régulièrement. Une cinétique de prélèvements sanguins, de 1 heure à 21 jours après l'injection, a été réalisée sur les animaux survivants.

IV ANALYSE STATISTIQUE

Le nombre d'animaux dans chaque groupe est indiqué par « n ». Les résultats sont exprimés par leur moyenne \pm l'écart standard à la moyenne (ESM). Les données sont analysées par un test non paramétrique de Kruskal Wallis (pour 3 groupes) ou du test de Mann-Whitney (2 groupes). La différence entre les moyennes était significative quand $p < 0,05$.

3^{ème} PARTIE :

Résultats et discussions

L'expression de FT a été étudiée sur l'ensemble des échantillons. L'activité FT n'est pas détectable dans les cellules non incubées (NI). L'activité FT a été mise en évidence dans des cellules mononucléées mises en culture pendant 16 heures. La technique de neutralisation à l'aide d'un anticorps anti-FT confirme que l'activité mesurée correspond à l'activité FT dans tous les cas.

I LAPINS TEMOINS

I-1 Résultats

L'ensemble des résultats présentés a été obtenu à partir de prélèvements effectués sur 60 lapins.

I-1-1 Paramètres cytologiques

Les paramètres cytologiques ont été dosés à l'aide d'un compteur.

Leucocytes	Erythrocytes	Hémoglobine	Hématocrite	Plaquettes
$10^9/l$	$10^{12}/l$	g/dl	%	$10^9/l$
$7,5 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,1$	$13 \pm 0,1$	$39 \pm 0,4$	447 ± 16

I-1-2 Formule leucocytaire

La formule a été lue sur frottis par trois personnes différentes.

Neutrophiles	Eosinophiles	Basophiles	Lymphocytes	Monocytes
$10^9/l$	$10^9/l$	$10^9/l$	$10^9/l$	$10^9/l$
$3,1 \pm 0,2$	$0,02 \pm 0,007$	$0,2 \pm 0,02$	$3,9 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,04$

Chez le lapin, les cellules classées comme neutrophiles sont dites pseudo éosinophiles, amphophiles ou hétérophiles. En effet, les granules sont arrondies et de taille assez uniforme

mais ne sont pas réparties sur toute la surface du cytoplasme comme chez un véritable éosinophile.

I-1-3 Tests de coagulation plasmatiques

TP	F II	F V	F VII+X	Fibrinogène
%	%	%	%	g/l
92 ± 2	99 ± 3	111 ± 5	101 ± 3	4,2 ± 0,2

I-1-4 FT : résultats fonctionnels

Les cellules fraîchement isolées qui ont été directement congelées n'expriment pas d'activité FT détectable. Les cellules cultivées 16 heures sous atmosphère humide à 5% de CO2 sans ou avec stimulation par l'endotoxine (5000 EU/ml) expriment une activité FT :

	Cellules non stimulées (I)	Cellules stimulées (I+E)
mU FT/1000 cellules	56 ± 8	94 ± 10
mU FT/ml de sang	15825 ± 2695	26826 ± 3836

La neutralisation par l'anticorps monoclonal anti-FT a été en moyenne de 89% (70-100%).

I-1-5 FT : résultats immunologiques

I-1-5-1 Immunocytochimie

L'expression de l'antigène FT a été mise en évidence par technique immunocytochimique (figure 10A).

Les monocytes non cultivés (NI) ne présentent pas de marquage. Dans les cellules cultivées sans endotoxine, en moyenne 47% des monocytes sont marqués. Dans les cellules

cultivées en présence d'endotoxine, 60% des monocytes sont marqués. On a pu mettre en évidence une variation d'intensité entre les monocytes d'une même lame (**figure 10B**).

Le marquage est exclusivement présent au niveau des monocytes, aucun lymphocyte ni aucune plaquette n'est marqué.

I-1-5-2 Immunohistochimie

L'expression de l'antigène FT a été mise en évidence sur coupe tissulaire par technique immunohistochimique (**figure 11**).

Le marquage de l'adventice (A) est intense et indique une forte expression de FT. Aucun marquage n'est détectable au niveau des cellules musculaires lisses de la media (M) ni au niveau des cellules endothéliales de l'intima (I).

I-2 Discussion

Les paramètres cytologiques et la formule leucocytaire du lapin sont assez proches des paramètres humains normaux.

Cette étude sur des lapins sains, nous a permis d'adapter les techniques de routine pour établir des normes fiables des différents paramètres hématologiques afin de mieux comprendre les désordres pouvant intervenir en pathologique.

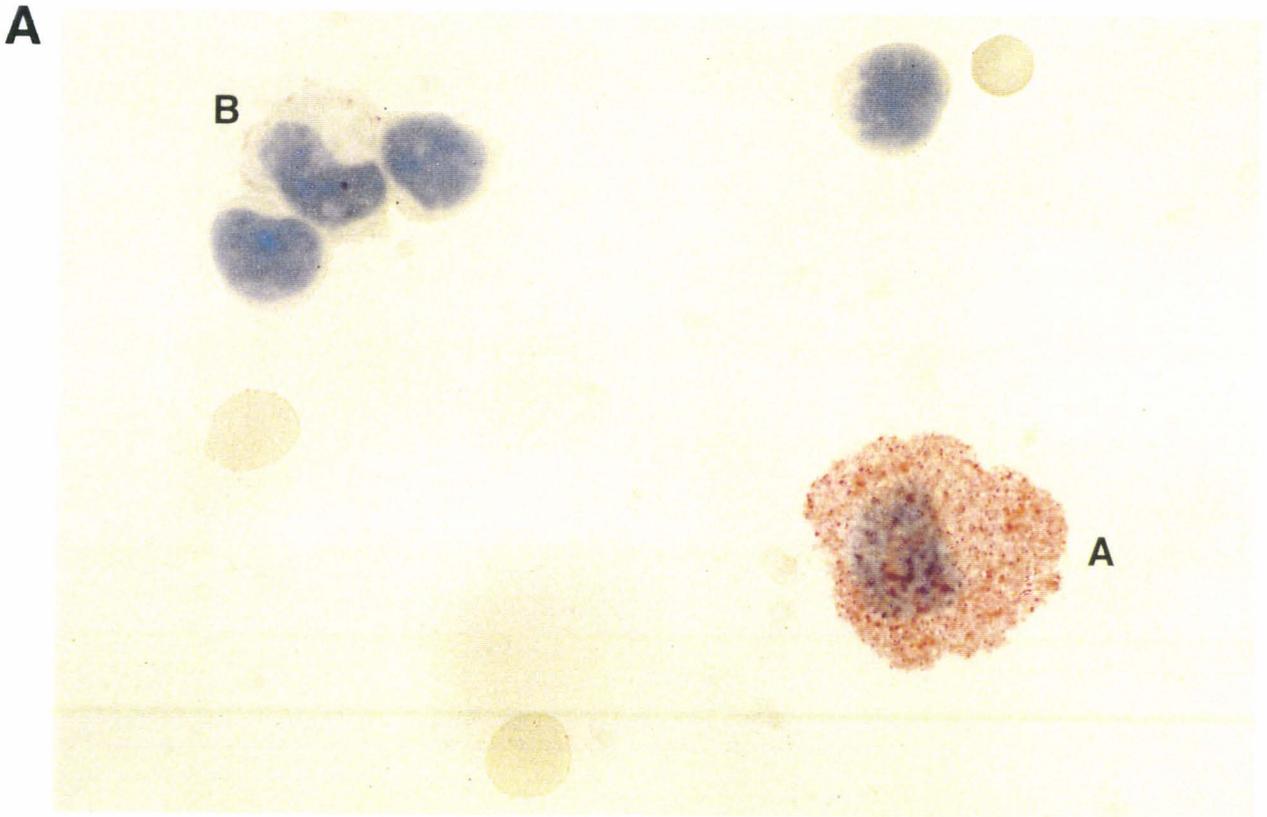
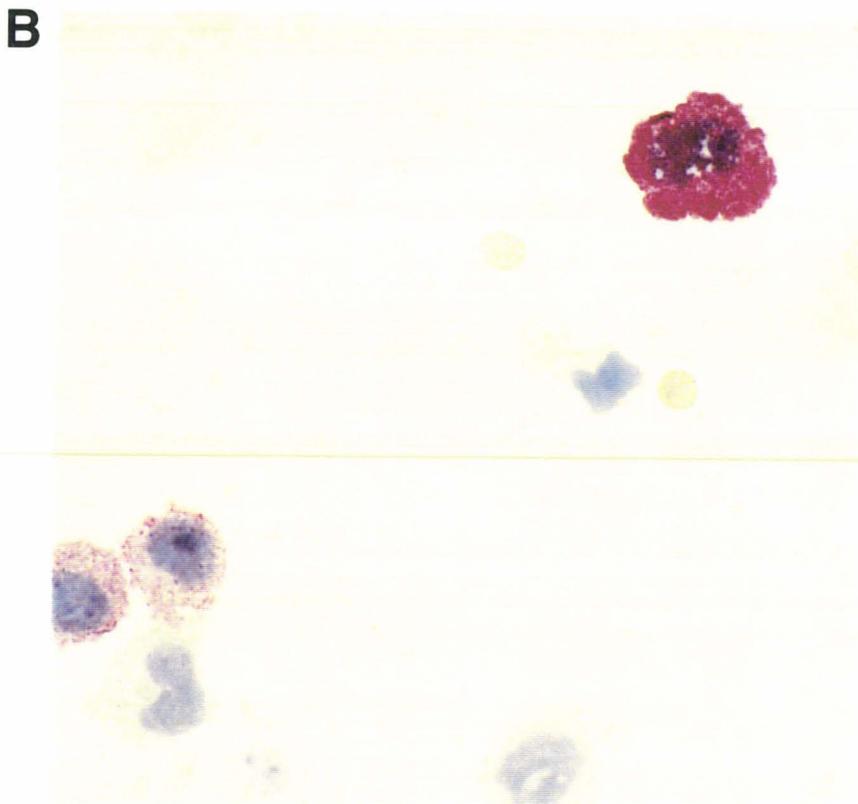


Figure 10 : Mise en évidence du Facteur Tissulaire par technique immunocytochimique.
Un monocyte fortement marqué (A) et un monocyte non marqué (B) sont représentés en A.
L'intensité variable de l'expression du FT monocytaire est représentée en B.



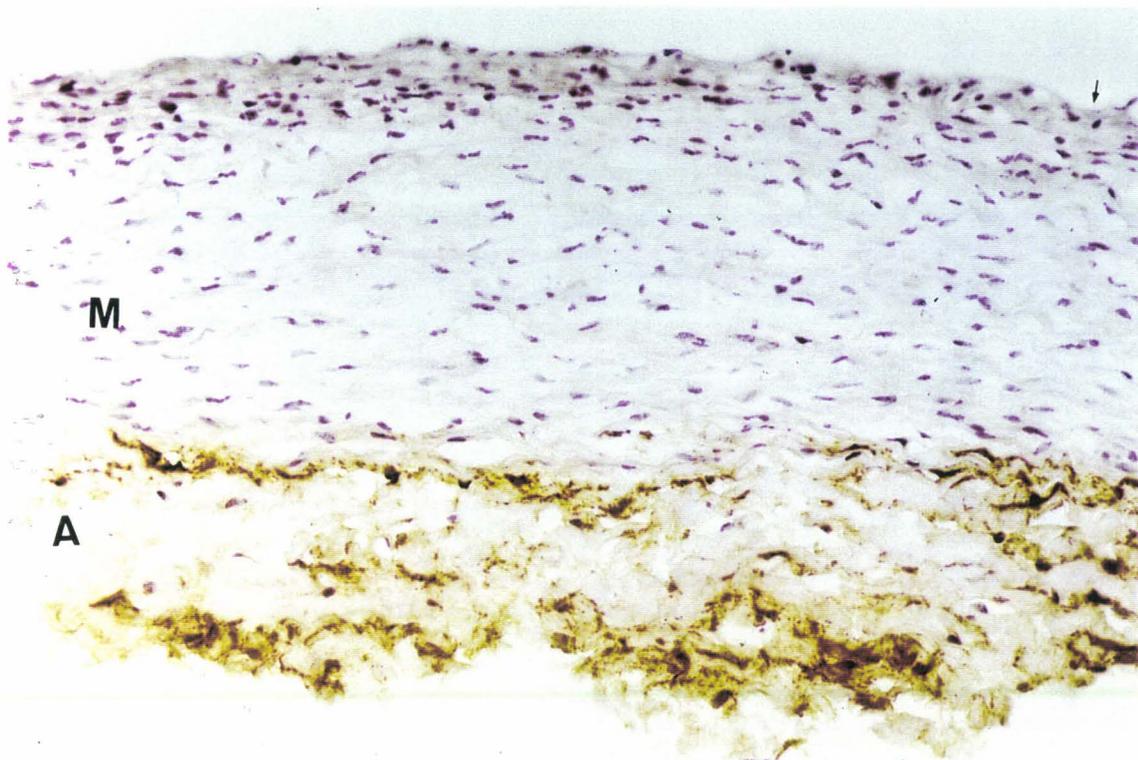


Figure 11 : Mise en évidence du Facteur Tissulaire sur coupe d'artère saine par technique immunohistochimique.

La flèche indique l'intima. La média (M) et l'adventice (A) sont représentées.

Seul l'adventice est marqué.

II LESION UNILATERALE ET BILATERALE

II-1 Résultats

Une complète dénudation de l'endothélium a été obtenue après lésion unilatérale par ballonnet comme nous l'a confirmé la technique au bleu Evans 24 heures après la dénudation. Sept jours après la lésion (J7), nous pouvons observer un début de réendothélialisation d'environ 15% qui se situe principalement au niveau des collatérales. Elle est d'environ 25% après 14 jours (J14). Après 28 jours (J28), la réendothélialisation est d'environ 60% (**Figure 13**). L'analyse histologique d'une coupe d'artère à J28 nous montre une hyperplasie néointimale importante de l'artère iliaque lésée (**Figure 16 B**) par rapport à l'artère iliaque saine (**Figure 16A**).

Nous pouvons observer une augmentation du nombre de leucocytes 24 heures après la dénudation. Ce nombre reste élevé à J7 et à J14 pour diminuer à J28. Cette variation est semblable pour les 3 groupes. Le nombre de monocytes varie en fonction du groupe. Chez les témoins ligaturés, il diminue après 2 heures puis augmente régulièrement jusque J28. Dans le groupe lésion unilatérale, le nombre de monocytes diminue après 24 heures, pour atteindre son niveau le plus bas à J7 puis augmente de nouveau à J14 pour se stabiliser à J28. Dans le groupe lésion bilatérale, il augmente progressivement pour atteindre son maximum à J14. La variation du nombre de plaquettes est relativement homogène entre les groupes (**Figure 14**).

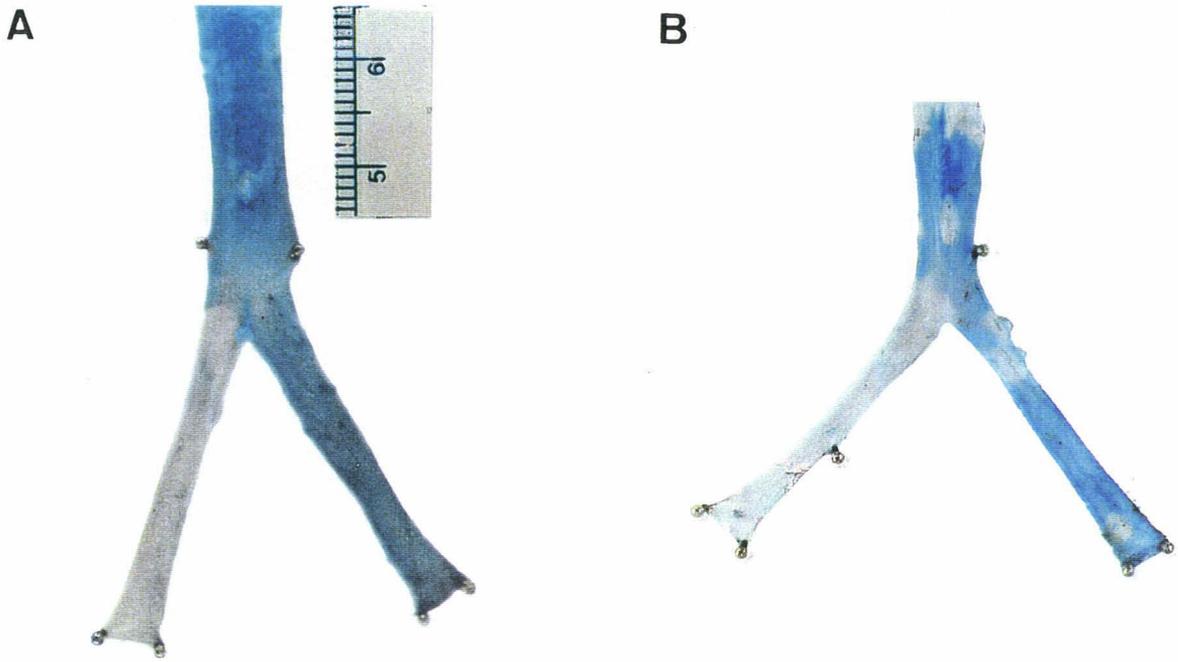
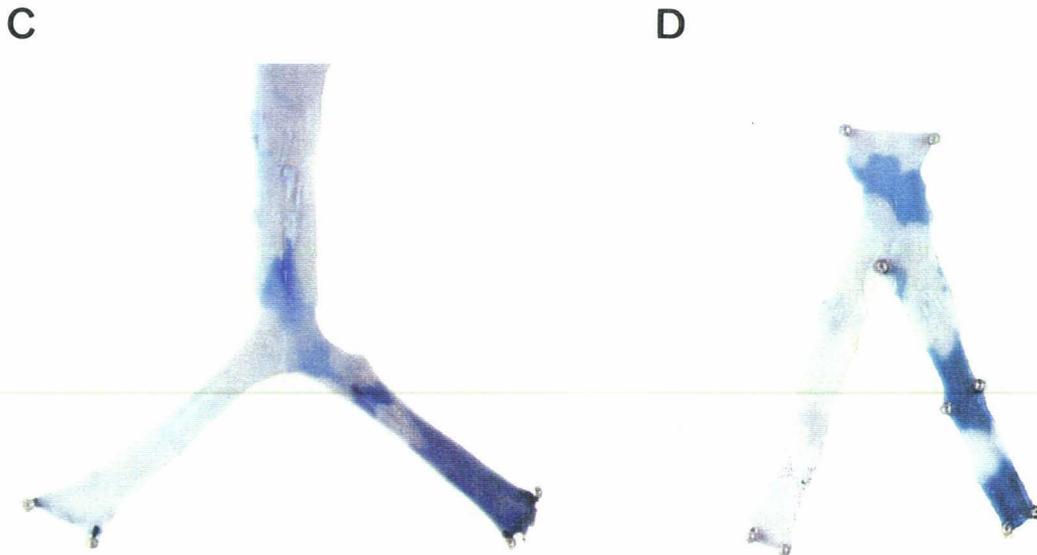


Figure 13 : Analyse de la réendothélialisation par coloration au bleu Evans.

En A est représentée une artère iliaque gauche 24 heures après la dénudation illustrant la désendothélialisation complète. En B est représentée une artère iliaque 7 jours après la dénudation, en C 14 jours après et en D 28 jours après la dénudation.

Les zones bleues correspondent aux zones non réendothélialisées.



Une diminution 2 heures après l'opération dans les groupes témoins et lésion unilatérale est observée puis le nombre de plaquettes dans ces groupes augmente pour atteindre son niveau de base et ne varie plus pendant le reste de la procédure. Dans le groupe lésion bilatérale, une faible augmentation est observable durant les 28 jours d'étude (**Figure 14**).

Les facteurs II, VII+X et le fibrinogène augmentent de façon significative après 24 heures dans les 3 groupes. Ils diminuent à J7 jusqu'à leur taux de base pour le groupe témoins et le groupe lésion unilatérale. Dans le groupe lésion bilatérale, ces facteurs augmentent encore à J14 et J28. Le TP est très élevé dès 2 heures dans ce groupe par rapport aux groupes témoins et lésion unilatérale (**Tableau III**).

Dans les cellules non stimulées (-E), l'expression de FT monocytaire est variable en fonction du temps dans les 3 groupes. Deux heures après l'opération, l'expression de FT est diminuée dans les 3 groupes. Dans le groupe lésion bilatérale, l'expression de FT augmente de façon progressive jusque J28. Elle est plus élevée par rapport aux autres groupes (**Figure 15A**).

Dans les cellules stimulées (+E), l'activité FT ne varie pas de façon significative dans les groupes témoins et lésion unilatérale. Dans le groupe lésion bilatérale, l'activité FT augmente progressivement à partir de 24 heures jusque J28 et est plus élevée par rapport aux autres groupes (**Figure 15B**).

L'étude des paramètres physiologiques liés à la coagulation nous montrent que la lésion bilatérale cause le plus de désordres sur une durée plus importante.

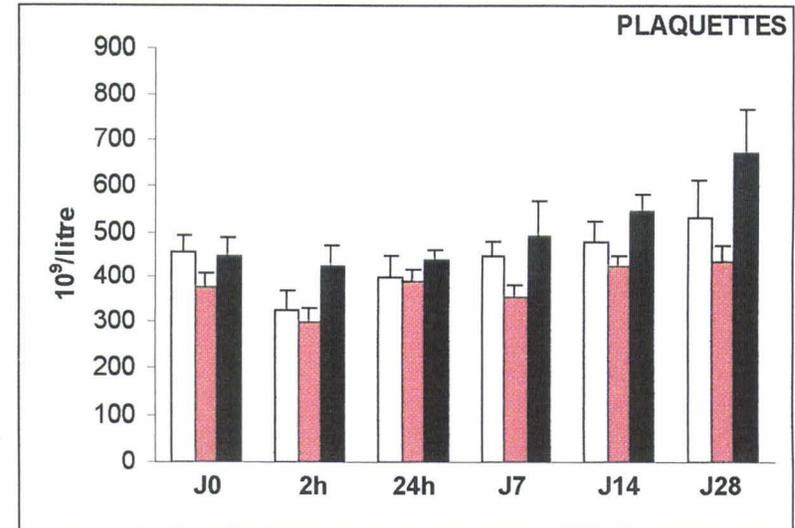
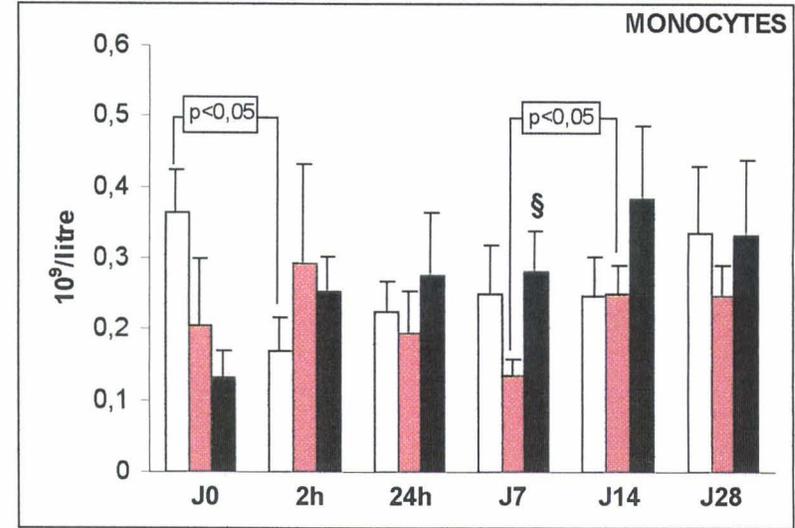
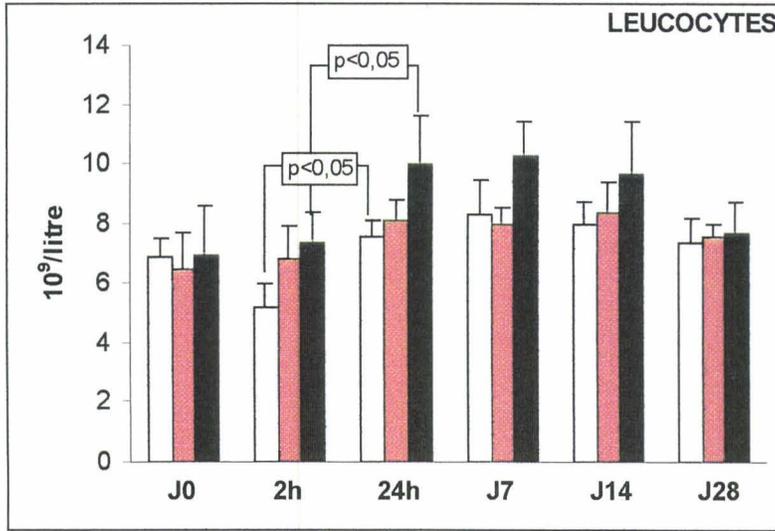


Figure 14 : Effet d'une lésion unilatérale ou bilatérale sur le nombre de leucocytes, le nombre de monocytes et le nombre de plaquettes. Variation en fonction du temps.

Les histogrammes non colorés correspondent aux lapins témoins ligaturés, les histogrammes colorés en orange correspondent aux lapins avec lésion unilatérale, les histogrammes colorés en noir correspondent aux lapins avec lésion bilatérale. Pour chacun des groupes n est égal à 7.
 § p<0,05 versus lésion unilatérale à J7

		TP %	F II %	F V%	F VII+X %	Fibrinogène g/l
J0	Témoins	77 ± 8	96 ± 8	106 ± 15	91 ± 7	4,1 ± 0,5
	Lésion unilatérale	81 ± 5	96 ± 10	100 ± 18	92 ± 7	4,4 ± 0,6
	Lésion bilatérale	97 ± 3	89 ± 6	87 ± 7	90 ± 5	4,0 ± 0,4
2h	Témoins	70 ± 4	74 ± 6	76 ± 10	80 ± 9	3,5 ± 0,2
	Lésion unilatérale	78 ± 6	87 ± 5	82 ± 10	81 ± 6	4,4 ± 0,6
	Lésion bilatérale	96 ± 3**§	93 ± 4*	98 ± 2	96 ± 2	5,0 ± 0,6*
24h	Témoins	85 ± 5	109 ± 4	97 ± 11	125 ± 7	6,2 ± 0,4
	Lésion unilatérale	85 ± 2	108 ± 9	125 ± 19	113 ± 6	6,8 ± 0,8
	Lésion bilatérale	109 ± 2**§§	108 ± 4	103 ± 7	115 ± 1	7,5 ± 0,4
J7	Témoins	71 ± 3	94 ± 5	89 ± 7	91 ± 9	4,1 ± 0,5
	Lésion unilatérale	81 ± 5	101 ± 3	105 ± 7	93 ± 4	4,2 ± 0,3
	Lésion bilatérale	100 ± 4**§	108 ± 8	106 ± 13	102 ± 11	6,3 ± 1
J14	Témoins	74 ± 3	100 ± 3	95 ± 7	93 ± 5	3,4 ± 0,2
	Lésion unilatérale	90 ± 8	97 ± 7	92 ± 4	97 ± 9	3,9 ± 0,2
	Lésion bilatérale	103 ± 3**	122 ± 6*§	129 ± 10*§	112 ± 9	5,1 ± 0,8
J28	Témoins	89 ± 5	108 ± 10	106 ± 15	90 ± 9	5,0 ± 1,1
	Lésion unilatérale	82 ± 6	93 ± 3	88 ± 8	89 ± 6	3,6 ± 0,1
	Lésion bilatérale	101 ± 3§	128 ± 9§§	147 ± 26§	114 ± 13	7,2 ± 1,7§

Tableau III : Effet d'une lésion unilatérale ou bilatérale sur les facteurs de coagulation. Variation en fonction du temps.
 * p<0,05 versus témoins ; ** p<0,005 versus témoins ; § p<0,05 versus lésion unilatérale ; §§ p<0,005 versus lésion unilatérale ;
en surligné p<0,05 versus le même groupe au temps précédent.

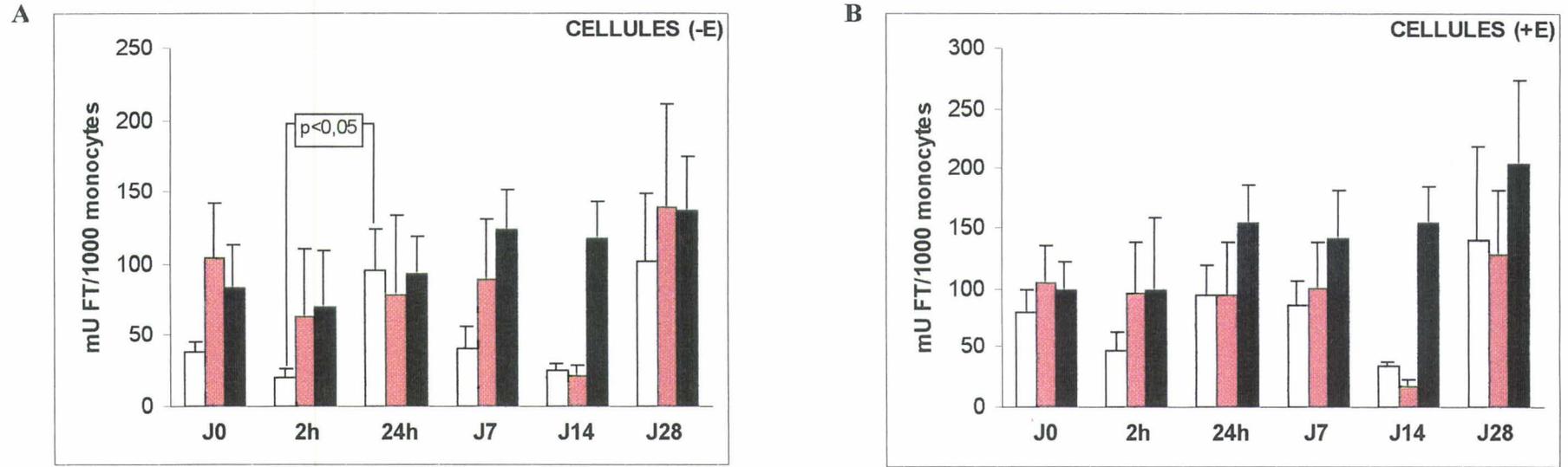


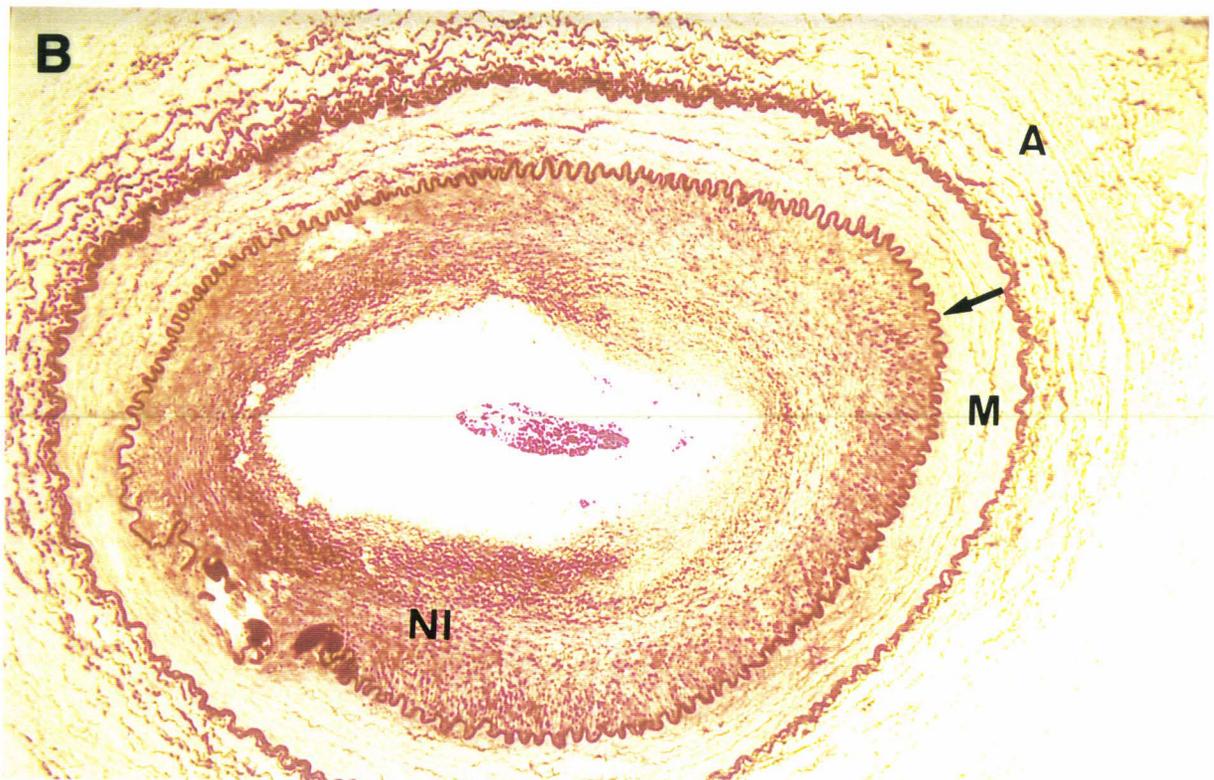
Figure 15 : Effet d'une lésion unilatérale ou bilatérale sur l'expression de FT monocytaire. Variation en fonction du temps.

Les histogrammes non colorés correspondent aux lapins témoins ligaturés, les histogrammes colorés en orange correspondent aux lapins avec lésion unilatérale, les histogrammes colorés en noir correspondent aux lapins avec lésion bilatérale. Pour chacun des groupes n est égal à 7. Le graphique A correspond aux cellules cultivées sans endotoxine (-E), le graphique B correspond aux cellules cultivées avec endotoxine (+E).



Figure 16 : Coupes histologiques d'artères iliaques 28 jours après la lésion unilatérale par ballonnet.

Les flèches indiquent la limitante élastique interne. L'adventice (A), la média (M) et la néointima (NI) sont représentés. En A, l'artère normale ; en B, l'artère préalablement désendothérialisée (coloration à l'orcéine Van-Gieson).



II-2 Discussion

Nos résultats ont déterminé que le modèle de lésion bilatérale est le modèle le plus agressif de dénudation artérielle. En effet, dans ce modèle, 24 heures après la désendothélialisation, nous avons observé une augmentation du nombre de leucocytes et du nombre de monocytes associée à une augmentation des facteurs de la coagulation. De même, l'expression de FT monocytaire augmente progressivement dès 24 heures. Cette augmentation d'expression se poursuit jusque J28. Les monocytes du groupe lésion bilatérale expriment plus de FT que les monocytes des autres groupes.

Lors d'une dénudation artérielle, il se produit très rapidement une agrégation plaquettaire (308) et une adhésion leucocytaire favorisant la libération de différentes substances telles que des cytokines et des facteurs de croissance. Ces substances peuvent activer les monocytes circulants qui, en réponse, expriment du FT. Elles favorisent également l'activation des CMLs qui passent d'un phénotype contractile à un phénotype sécrétoire (309). Elles entrent en cycle de croissance dès la 24^{ème} heure. Les CMLs migrent dans l'intima à partir du 4^{ème} jour et y prolifèrent (310). La prolifération cellulaire est maximale entre 4 et 7 jours et conduit à un épaissement néointimal, qui est maximal après 3 mois (262) moment où les CMLs retrouvent leur phénotype contractile (312). Le degré de prolifération varie en fonction du degré de la lésion provoquée (313). Le traumatisme causé par le ballonnet provoque également l'accumulation d'une matrice extracellulaire riche en collagène synthétisée par les CMLS (314). La réendothélialisation débute à partir de la limite de la région dénudée dès le 3^{ème} jour et s'arrête environ 6 semaines après la lésion initiale (315-316). Cette régénération endothéliale est rarement totale (317).

Ce modèle de lésion sans régime associé nous a permis de suivre l'évolution des paramètres physiologiques associés à la coagulation lors d'un traumatisme infligé par ballonnet provoquant une désendothélialisation complète de l'artère iliaque.

III LESION BILATERALE ASSOCIEE A UNE HYPERCHOLESTEROLEMIE

III-1 Résultats

Les taux de cholestérol (chol) et de triglycérides (TG) plasmatiques sont très élevés après 6 semaines de régime enrichi en cholestérol (chol : 3052 ± 278 mg/dl ; TG : 489 ± 147 mg/dl versus chol : 37 ± 3 mg/dl ; TG : 108 ± 17 mg/dl, $p < 0,004$).

Le nombre de leucocytes augmente de façon significative à 6 semaines par rapport aux contrôles. Il n'y a pas de différence significative sur le nombre de monocytes même si nous pouvons observer une légère diminution à 3 semaines. Une réduction progressive du nombre de plaquettes est observée et va se poursuivre jusqu'à la fin de la procédure (**Tableau IV**).

Après 3 semaines de régime enrichi en cholestérol, nous pouvons observer une augmentation significative des facteurs II ($149 \pm 7\%$ versus 94 ± 5 chez les contrôles, $p < 0,0001$) et VII+X ($151 \pm 7\%$ versus 92 ± 4 chez les contrôles, $p < 0,0001$) qui restent très élevés durant toute la procédure. Aucune différence significative n'est observée pour le FV ($115 \pm 8\%$ versus $103 \pm 10\%$ chez les contrôles, $p = \text{NS}$). Le fibrinogène diminue 6 semaines après la lésion bilatérale et l'initiation du régime par rapport aux contrôles ($2,9 \pm 0,3$ versus $4,6 \pm 0,4$ g/l, $p < 0,0005$) et reste à ce taux après angioplastie ($2,4 \pm 0,3$ g/l).

Dans les cellules non stimulées (-E), une diminution de l'expression de FT est observée 3 semaines après la lésion bilatérale et l'initiation du régime (20 ± 3 versus 66 ± 20 mU FT/1000 monocytes, $p = 0,02$). Cette expression reste très faible par rapport aux contrôles durant toute la procédure (**Figure 17A**).

		Leucocytes 10⁹/litre	Monocytes 10⁹/litre	Plaquettes 10⁹/litre
préangioplastie	Contrôles, n=18	7,4 ± 0,5	0,23 ± 0,04	464 ± 28
	3 semaines, n=18	7,5 ± 0,4	0,15 ± 0,02	373 ± 22*
	6 semaines, n=15	10,1 ± 0,6§	0,22 ± 0,05	321 ± 29§
postangioplastie	Groupe non traité, n=7	8,5 ± 1,1	0,33 ± 0,13	238 ± 44§
	Groupe L-arg, n=8	9,4 ± 0,9	0,34 ± 0,11	274 ± 20§

Tableau IV : Effet de l'hypercholestérolémie, de l'angioplastie et de la L-arginine sur le nombre de leucocytes, le nombre de monocytes et le nombre de plaquettes.

*P<0,05 versus contrôles, §P<0,005 versus contrôles

	Groupe non traité, n=7	Groupe L-arg, n=8
TP %	113 ± 8	106 ± 8
Factor II %	151 ± 12	177 ± 15
Factor V %	76 ± 11	106 ± 13
Factor VII+X %	153 ± 7	187 ± 16
Fibrinogène g/litre	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,2

Tableau V : Variation des facteurs de la coagulation dans le groupe non traité et le groupe L-arg.

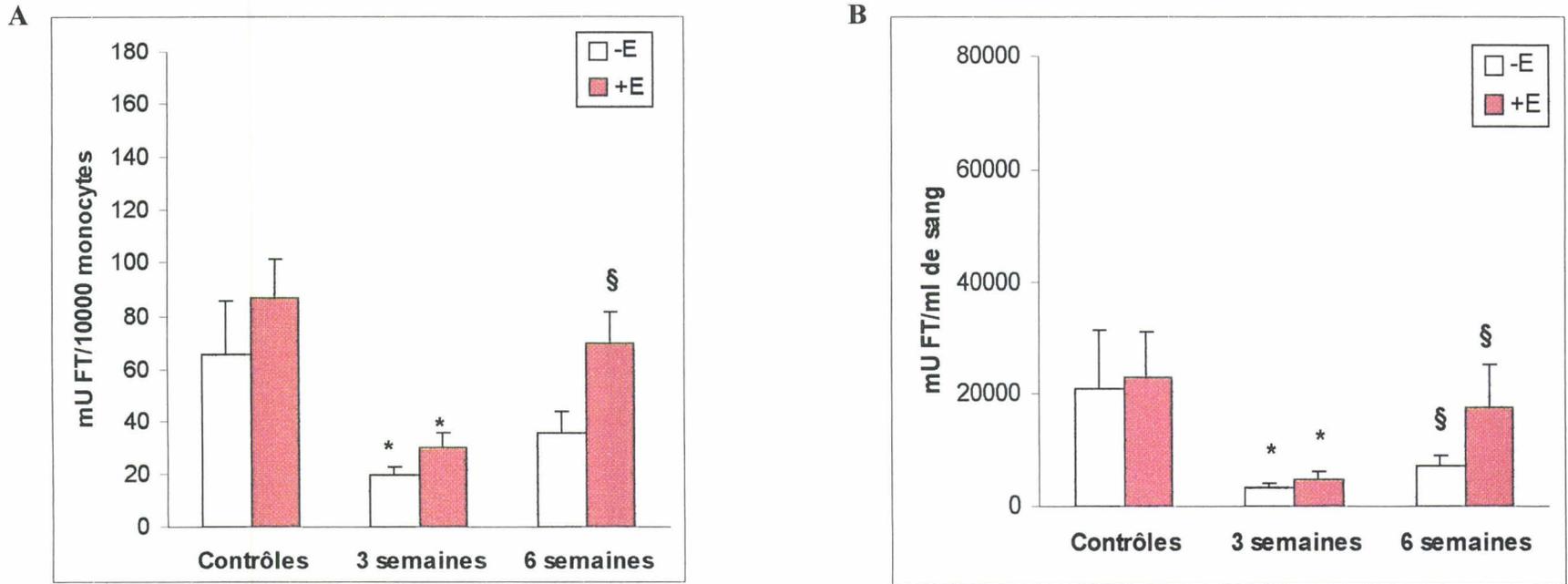


Figure 17 : Effet de la lésion bilatérale associée au régime enrichi en cholestérol sur l'expression de FT monocytaire.

Les histogrammes non colorés correspondent aux cellules cultivées sans endotoxine (-E), les histogrammes colorés correspondent aux cellules cultivées avec de l'endotoxine (+E). Les résultats sont exprimés en mU de FT pour 1000 monocytes (A) ou en mU de FT par ml de sang (B).

Contrôles, n=18 ; 3 semaines, n=18 ; 6 semaines juste avant angioplastie, n=15.

* $0,004 \leq p < 0,05$ versus contrôles § $0,003 \leq p < 0,05$ versus 3 semaines.

Dans les cellules stimulées par l'endotoxine (+E), nous pouvons observer une diminution de l'activité FT à 3 semaines (30 ± 6 versus 87 ± 15 mU FT/1000 monocytes, $p < 0,005$) suivie d'une certaine normalisation à 6 semaines (70 ± 12 mU/1000 monocytes, $p < 0,005$ versus 3 semaines) (**Figure 17A**). Les résultats sont similaires lorsqu'ils sont exprimés par millilitre de sang (**Figure 17B**).

Les résultats du marquage en immunocytochimie avec l'anticorps anti-FT dans les cellules stimulées donnent des résultats concordants avec ceux de la technique fonctionnelle. Chez les contrôles, 71% des cellules stimulées sont positives pour le FT, 63% sont positives à 3 semaines et 81% sont positives à 6 semaines.

III-2 Discussion

Trois semaines après la dénudation artérielle et l'initiation du régime enrichi en cholestérol, nous avons pu observer une diminution de l'activité du FT monocytaire. Les raisons de cette diminution sont mal connues, mais pourraient être liées à la disparition de la circulation sanguine des monocytes. Nous avons d'ailleurs pu observer une diminution du nombre de monocytes pendant cette période reflétant une augmentation possible de l'adhésion et de la pénétration des monocytes dans la paroi vasculaire (318-319). Une autre hypothèse envisageable de l'absence d'augmentation d'expression du FT par les monocytes circulants de lapins hypercholestérolémiques serait l'absence de récepteurs « éboueurs » (scavenger) à la surface membranaire des monocytes. En effet, une étude récente a démontré, lors de la différenciation des monocytes en macrophages, que ces derniers expriment un taux de FT très élevé dès que le récepteur « éboueur » est exprimé (320). Il a aussi été démontré que des macrophages mis en présence de lipides, en particulier des LDL oxydées, expriment plus de FT in vitro (52-53) et in vivo (26). D'un autre côté, l'hypercholestérolémie pourrait modifier

la composition lipidique des membranes monocytaires en modulant ainsi l'activité du FT ou en augmentant l'activité du TFPI comme cela a été démontré chez l'homme (321).

Pendant cette période, une diminution du nombre de plaquettes et une diminution du fibrinogène sont observées, suggérant un processus de consommation. Les facteurs vitamine K-dépendants (FVII et FX) augmentent de façon significative comme l'avait déjà démontré Mitropoulos et al. (322). L'augmentation du taux de FX est due à une augmentation de sa synthèse. L'augmentation du FVII chez le lapin hypercholestérolémique est due à la fois à sa synthèse augmentée mais aussi à une augmentation de l'activation du FVII (323).

IV EFFET DE L'ANGIOPLASTIE

IV-1 Résultats

Six semaines après la lésion bilatérale associée au régime enrichi en cholestérol, les lapins survivants ont subi une angioplastie. Ils restent sous régime enrichi pendant encore 4 semaines avant d'être prélevés.

Les taux de cholestérol et de triglycérides plasmatiques restent très élevés (chol : 3190 ± 376 mg/dl ; TG : 783 ± 201 mg/dl, $p < 0,0005$ versus contrôles).

Le nombre de leucocytes ne varie pas par rapport à 6 semaines (juste avant angioplastie). Il n'y a pas de variation significative du nombre de monocytes et le nombre de plaquettes est au plus bas (**Tableau IV**).

Dans les cellules non stimulées (-E), l'expression de FT ne varie pas par rapport aux cellules des lapins à 6 semaines (37 ± 14 versus 36 ± 8 mU FT/1000 monocytes, $p = \text{NS}$) (**Figure 18 A**).

Dans les cellules stimulées (+E), l'activité FT est augmentée de façon significative 4 semaines après angioplastie dans le groupe non traité par rapport à l'activité mesurée juste avant angioplastie (138 ± 22 versus 70 ± 12 mU FT/1000 monocytes, $p=0,02$) (**Figure 18 A**). Les résultats sont similaires lorsqu'ils sont exprimés par millilitre de sang (**Figure 18 B**).

IV-2 Discussion

Quatre semaines après lésion de la plaque par angioplastie, une augmentation de la réponse du FT monocyttaire à l'endotoxine est observée sans doute due à une activation accrue des monocytes circulants, comme décrit dans les maladies coronaires humaines en particulier dans les syndromes coronaires instables (189-191). L'activation leucocytaire a été décrite dans les premiers jours suivant l'angioplastie coronaire chez l'homme (324) mais aucune étude n'a été réalisée plusieurs semaines après l'agression par ballonnet. L'hypothèse semble être que la rupture par angioplastie d'une plaque athéroscléreuse riche en lipides peut favoriser les contacts entre les constituants de la plaque en particulier les cellules spumeuses, les lymphocytes T et les macrophages activés qui sont capable d'induire la production de cytokines et donc d'activer le gène du FT (178). Ainsi, dans notre modèle, l'initiateur de l'augmentation de la réponse du FT monocyttaire semble être le contact entre les constituants de la plaque athéroscléreuse et le sang. Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par l'observation faite, sur des lapins placés 10 semaines sous régime enrichi en cholestérol sans aucune dénudation artérielle, d'une absence d'augmentation de la réponse du FT comme l'a également démontré Semeraro et al. (325).

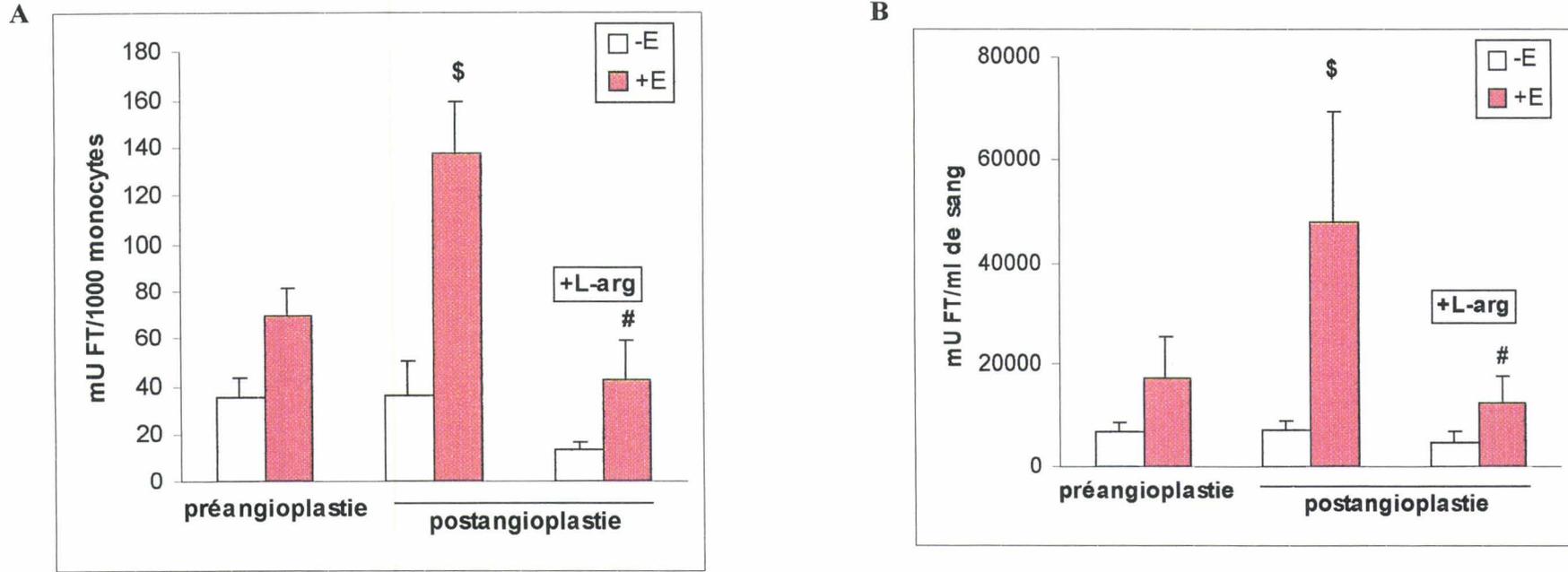


Figure 18 : Effet de l'angioplastie et du traitement L-arg sur l'expression de FT monocytaire.

Les histogrammes non colorés correspondent aux cellules cultivées sans endotoxine (-E), les histogrammes colorés correspondent aux cellules cultivées avec de l'endotoxine (+E). Les résultats sont exprimés en mU de FT pour 1000 monocytes (A) ou en mU de FT par ml de sang (B).

6 semaines juste avant angioplastie (préangioplastie, n=15) ; 4 semaines après angioplastie sans traitement (groupe non traité, n=7) ;

4 semaines après angioplastie avec traitement L-arg (groupe L-arg, n=8).

\$ p<0,05 versus préangioplastie # p<0,05 versus groupe non traité

V MODULATION DE L'EXPRESSION DU FT

V-1 Effet de la L-arginine (L-arg)

V-1-1 Résultats

Une partie des lapins ayant subi une angioplastie sont placés sous traitement L-arg. Ce traitement permet d'augmenter le taux d'arginine plasmatique de façon significative (315 ± 65 versus 124 ± 11 $\mu\text{mol/l}$ dans le groupe non traité, $p < 0,05$).

La L-arg n'a aucune influence sur les taux de cholestérol et de triglycérides plasmatiques (chol : 3060 ± 303 mg/dl ; TG : 528 ± 129 mg/dl). Aucune différence n'est observée entre le groupe non traité et le groupe L-arg pour le nombre de leucocytes, de monocytes et de plaquettes, ni pour les facteurs de la coagulation. La L-arg n'a donc pas d'effet sur ces paramètres (**Tableaux IV et V**).

Dans les cellules non stimulées (-E), il n'y a pas de différence significative avec le groupe non traité et le groupe L-arg même si l'expression de FT est plus faible dans le groupe L-arg (14 ± 3 versus 37 ± 14 mU FT/1000 monocytes, $p = \text{NS}$) (**Figure 18 A**).

Dans les cellules stimulées (+E), l'augmentation de l'activité FT observée dans le groupe non traité n'est pas retrouvée dans le groupe L-arg. Au contraire, l'activité FT est fortement diminuée (43 ± 16 versus 138 ± 22 mU/1000 monocytes, $p = 0,01$) (**Figure 18 A**). Les résultats sont similaires lorsqu'ils sont exprimés par millilitre de sang (**Figure 18 B**).

Les résultats du marquage en immunocytochimie avec l'anticorps anti-FT dans les cellules stimulées donnent des résultats concordants avec ceux de la technique fonctionnelle.

Dans le groupe non traité, 4 semaines après angioplastie, 92% des cellules sont positives pour le FT contre 65% dans le groupe traité à la L-arg.

		Leucocytes 10⁹/litre	Monocytes 10⁹/litre	Plaquettes 10⁹/litre
préangioplastie	Contrôles, n=18	7,4 ± 0,5	0,23 ± 0,04	464 ± 28
	3 semaines, n=18	7,5 ± 0,4	0,15 ± 0,02	373 ± 22*
	6 semaines, n=15	10,1 ± 0,6§	0,22 ± 0,05	321 ± 29§
postangioplastie	Groupe non traité, n=7	8,5 ± 1,1	0,33 ± 0,13	238 ± 44§
	Groupe L-arg, n=8	9,4 ± 0,9	0,34 ± 0,11	274 ± 20§

Tableau IV : Effet de l'hypercholestérolémie, de l'angioplastie et de la L-arginine sur le nombre de leucocytes, le nombre de monocytes et le nombre de plaquettes.

*P<0,05 versus contrôles, §P<0,005 versus contrôles

	Groupe non traité, n=7	Groupe L-arg, n=8
TP %	113 ± 8	106 ± 8
Factor II %	151 ± 12	177 ± 15
Factor V %	76 ± 11	106 ± 13
Factor VII+X %	153 ± 7	187 ± 16
Fibrinogène g/litre	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,2

Tableau V : Variation des facteurs de la coagulation dans le groupe non traité et le groupe L-arg.

V-1-2 Discussion

Le résultat principal de la première partie de l'étude a été l'augmentation significative de l'expression de FT par les monocytes après angioplastie dans un modèle d'athérosclérose induite par la dénudation des artères iliaques associée à un régime enrichi en cholestérol. L'administration par voie orale de L-arginine empêche cette augmentation de la réponse du FT monocytaire. Cet effet pourrait être dû aux propriétés antiathérogéniques de la L-arginine. En effet, il a été démontré que l'hypercholestérolémie entraînait une augmentation de la synthèse d'anion superoxyde par les cellules endothéliales, composé jouant un rôle clé dans la pathogénèse de l'athérosclérose (326-327) et que la L-arginine était capable de moduler ce processus (286,293).

Le NO peut également inhiber l'activité de la protéine de transcription NFκB ou inhiber l'anion superoxyde qui active NFκB (289-290,297, 328). Comme l'activation du gène du FT par l'endotoxine est dépendante de l'activation de NFκB, la modulation par le NO de la réponse du FT monocytaire pourrait se produire par la limitation de cette voie transcriptionnelle dépendante de l'oxydation, par un processus déjà décrit pour les molécules adhésives endothéliales (329). Récemment, il a été démontré qu'un antioxydant d'origine végétal pouvait inhiber l'expression du gène du FT induite par les cytokines, en partie par l'inhibition de l'activation de NFκB dans des cellules endothéliales en culture (265). Par ailleurs, une autre étude a démontré in vitro que les antioxydants diminuaient l'expression du FT par les monocytes/macrophages mais par un effet post-transcriptionnel (266).

Ces éléments suggèrent que le NO pourrait diminuer la réponse du FT monocytaire par un mécanisme transcriptionnel ou post-transcriptionnel. L'analyse de l'ARNm du FT monocytaire nous permettrait de mieux cerner le rôle de ces deux mécanismes possibles.

Nos résultats suggèrent que les propriétés antithrombotiques du NO pourraient aussi être dues à un effet inhibiteur sur la réponse du FT monocytaire, en plus de ses effets sur les

fonctions plaquettaires et endothéliales. Une génération locale suffisante de NO par les cellules endothéliales ou les macrophages, après traitement par la L-arginine, pourrait diminuer l'activation de la coagulation initiée par le FT dans le processus d'athérosclérose. La L-arginine est connue pour réduire l'adhésion monocytaire aux cellules endothéliales in vitro (290) et pour restaurer une dilatation dépendante de l'endothélium chez des patients hypercholestérolémiques (330). Ces effets sont peut-être limités aux lésions athéroscléreuses précoces (331). Il a aussi été démontré chez des volontaires sains qu'un traitement oral avec de la L-arginine inhibait l'agrégation plaquettaire (332). Comme agent thérapeutique, la L-arginine pourrait avoir un impact via ces propriétés antithrombotiques dans le traitement ou la prévention des maladies vasculaires liées à l'athérosclérose.

V-2 Effet du bFGF

V-2-1 Résultats

L'effet du bFGF a été étudié sur deux groupes de lapins, l'un préalablement placé sous régime enrichi en cholestérol pendant 6 semaines, l'autre composé de lapins placés sous nourriture standard. Aucun décès n'a été observé dans les deux groupes.

Le cholestérol plasmatique est très élevé après 6 semaines de régime enrichi (1950 ± 354 mg/dl versus 32 ± 2 mg/dl chez les lapins normaux, $p < 0,0001$). Les triglycérides ne varient pas entre les groupes (188 ± 50 mg/dl versus 115 ± 15 mg/dl, $p = \text{NS}$). Le traitement au bFGF n'a aucune influence sur ces facteurs.

Le nombre de leucocytes est augmenté chez les lapins hypercholestérolémiques. Nous n'avons pas observé de variation significative du nombre de plaquettes. Le traitement par le bFGF n'a aucun effet sur ces paramètres (**Figure 19**).

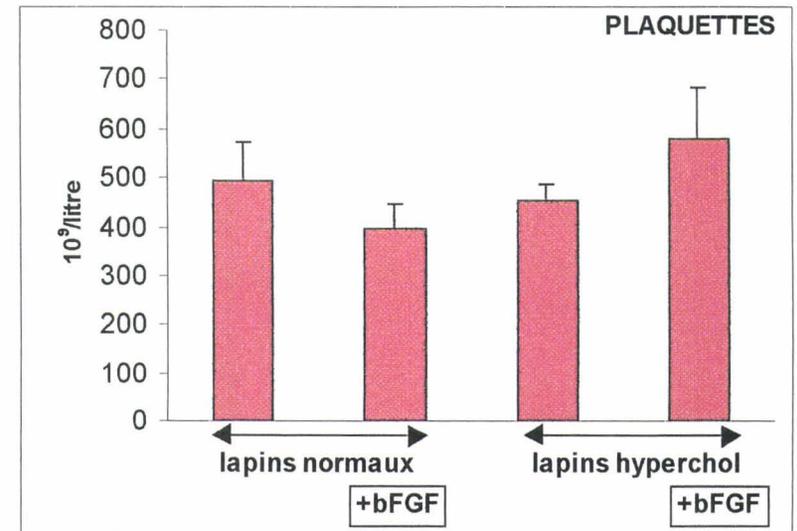
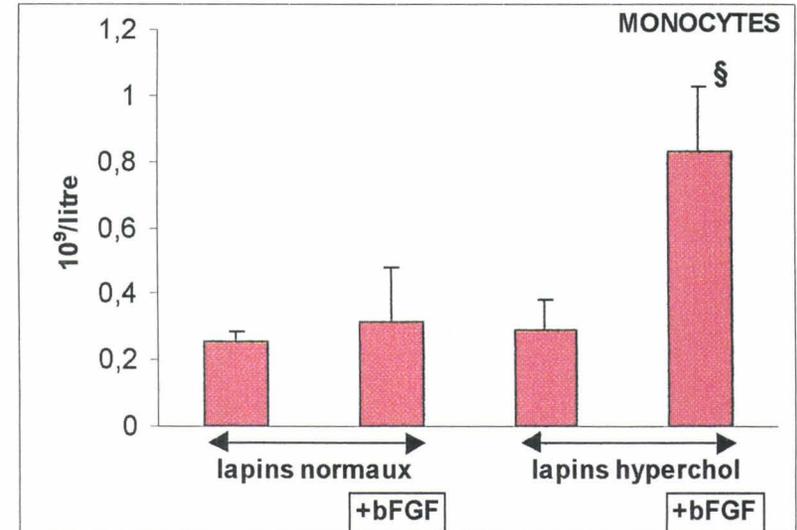
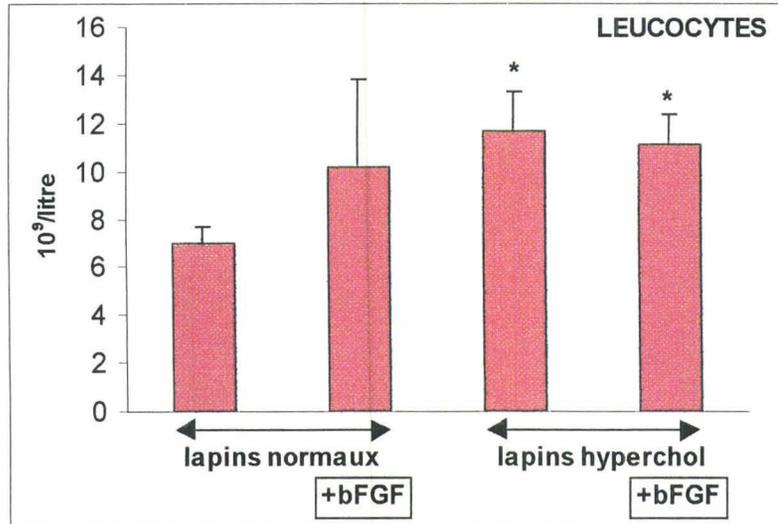


Figure 19 : Effet de l'hypercholestérolémie et du traitement bFGF sur le nombre de leucocytes, le nombre de monocytes et le nombre de plaquettes.

* $p < 0,05$ versus lapins normaux § $p < 0,05$ versus lapins hypercholestérolémiques

Le nombre de monocytes ne varie pas entre les lapins normaux non traités, les lapins normaux traités au bFGF et les lapins hypercholestérolémiques. Par contre, les lapins hypercholestérolémiques traités au bFGF ont un nombre de monocytes élevé par rapport aux autres lapins (**Figure 19**).

Après 6 semaines de régime, nous observons une augmentation significative des facteurs II ($154 \pm 5\%$ versus $92 \pm 7\%$ chez les lapins normaux, $p=0,006$) et VII+X ($178 \pm 5\%$ versus $94 \pm 5\%$ chez les lapins normaux, $p=0,006$). Aucune différence n'est observée pour le FV ($136 \pm 8\%$ versus $116 \pm 12\%$ chez les lapins normaux, $p=NS$). Le fibrinogène est diminué après 6 semaines par rapport aux lapins normaux ($3,4 \pm 0,2$ g/l versus $6,0 \pm 0,7$ g/l, $p=0,01$). L'injection de bFGF n'influence pas ces facteurs (**Tableau VI**).

Effet du bFGF sur l'expression de FT monocytaire chez les lapins normaux

Dans les cellules non stimulées (-E), le bFGF induit l'expression de FT par rapport aux lapins normaux non traités (164 ± 57 versus 74 ± 41 mU FT/1000 monocytes, $p=NS$) (**Figure 20A**).

Dans les cellules stimulées (+E), la réponse du FT monocytaire à l'endotoxine n'est pas augmentée par rapport à celle observée dans les cellules non stimulées des lapins normaux traités au bFGF (148 ± 46 mU FT/1000 monocytes) (**Figure 20A**).

Effet de l'hypercholestérolémie sur la réponse FT monocytaire

Dans les cellules non stimulées (-E), l'expression de FT est diminuée 6 semaines après l'initiation du régime enrichi en cholestérol (32 ± 12 versus 74 ± 41 mU FT/1000 monocytes, $p=NS$) (**Figure 20A**).

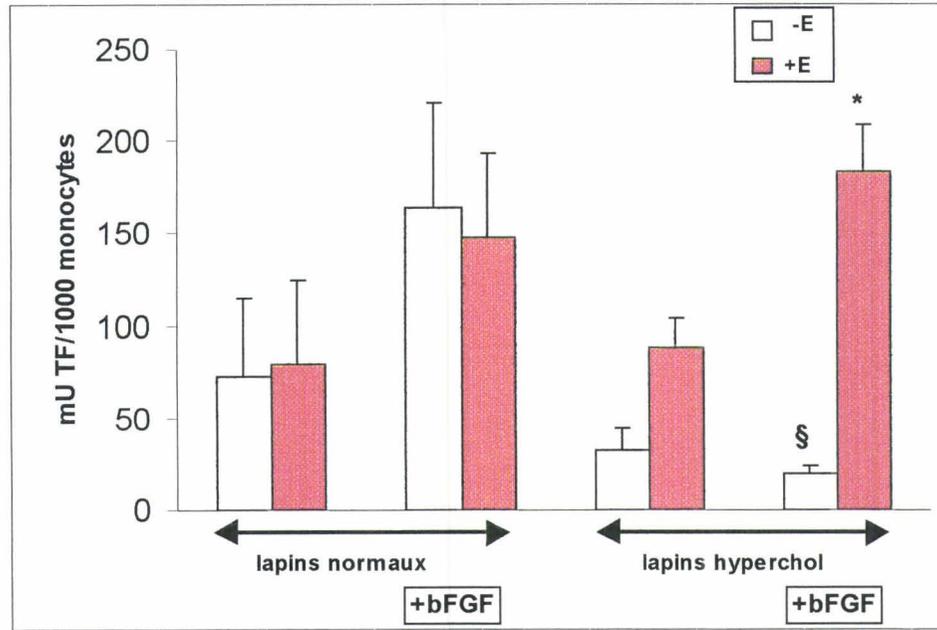


	TP %	F II %	F V %	F VII+X %	Fibrinogène g/litre
Lapins normaux n=6	91 ± 2	92 ± 7	116 ± 12	94 ± 5	6,0 ± 0,7
Lapins normaux + bFGF, n=6	91 ± 2	93 ± 2	128 ± 11	90 ± 4	5,8 ± 0,6
Lapins hypercholestérolémiques n=6	111 ± 5*	154 ± 5*	136 ± 8	178 ± 5*	3,4 ± 0,2*
Lapins hypercholestérolémiques + bFGF, n=6	101 ± 2	147 ± 5*	157 ± 4	163 ± 2*	3,0 ± 0,1*

Tableau VI : Effet de l'hypercholestérolémie et du traitement bFGF sur les facteurs de la coagulation.

* P<0,005 versus lapins normaux et versus lapins normaux + bFGF.

A



B

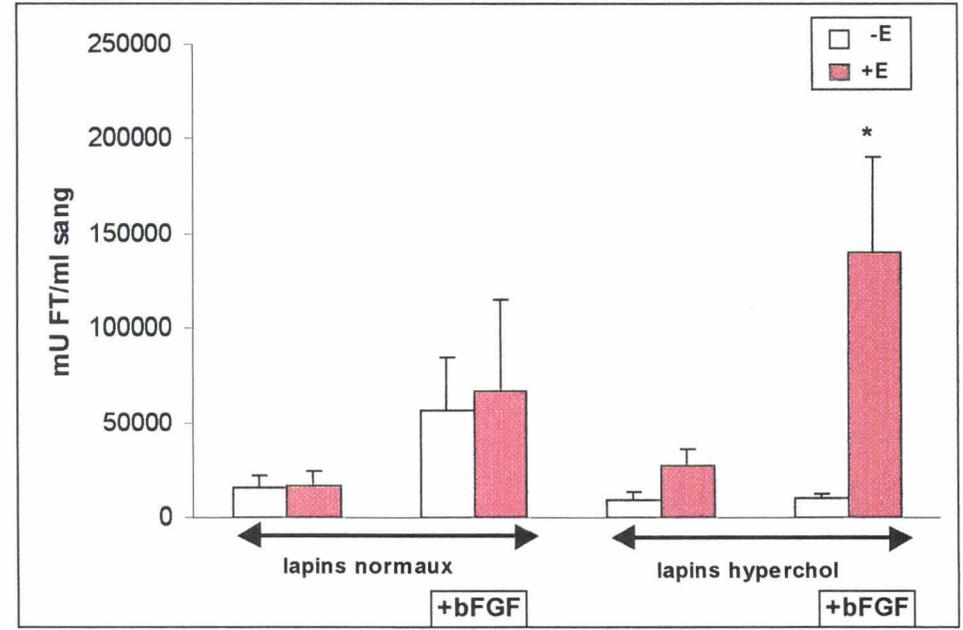


Figure 20 : Effet de l'hypercholestérolémie et du traitement bFGF sur l'expression de FT monocytaire

Les histogrammes non colorés correspondent aux cellules cultivées sans endotoxine (-E), les histogrammes colorés correspondent aux cellules cultivées avec de l'endotoxine (+E). Les résultats sont exprimés en mU de FT pour 1000 monocytes (A) ou en mU de FT par ml de sang (B).

Dans chaque groupe n est égal à 6. * $p < 0,05$ versus lapins hypercholestérolémiques § $p < 0,05$ versus lapins normaux+bFGF

Dans les cellules stimulées (+E), il n'y a pas de différence dans la réponse du FT monocytaire par rapport à celle des cellules stimulées des lapins normaux (89 ± 15 versus 80 ± 45 mU FT/1000 monocytes, $p=NS$) (**Figure 20A**).

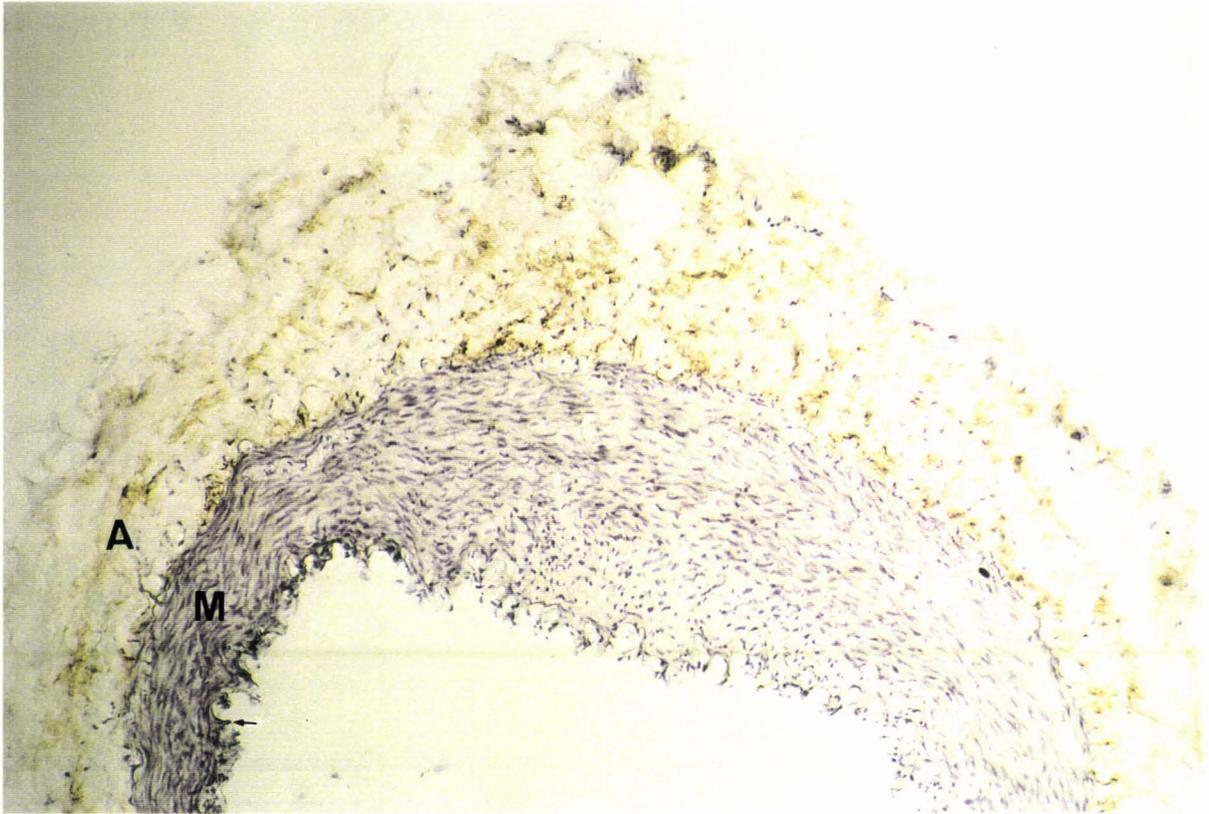
Effet du bFGF sur l'expression de FT monocytaire chez les lapins hypercholestérolémiques

Dans les cellules non stimulées (-E), l'expression de FT n'augmente pas chez les lapins traités au bFGF, elle est même diminuée par rapport à celle des lapins normaux traités et celle des lapins hypercholestérolémiques non traités (19 ± 5 versus 74 ± 41 chez les lapins normaux, $p=0,07$ et 32 ± 12 mU FT/1000 monocytes chez les lapins hypercholestérolémiques, $p=NS$). L'expression de FT diminue de façon significative par rapport aux lapins normaux traités au bFGF ($p<0,05$) (**Figure 20A**).

Dans les cellules stimulées (+E), la réponse du FT monocytaire est significativement augmentée par rapport à celle des lapins hypercholestérolémiques non traités (184 ± 25 versus 89 ± 15 mU FT/1000 monocytes, $p<0,05$). Elle est similaire à la réponse obtenue chez les lapins sains traités au bFGF (164 ± 57 mU FT/1000 monocytes) (**Figure 20A**). Les résultats sont similaires lorsqu'ils sont exprimés par millilitre de sang (**Figure 20B**).

Les résultats obtenus par immunocytochimie sont concordants avec les résultats de l'activité fonctionnelle. Dans les cellules non stimulées, seuls 4% des monocytes sont positifs pour le FT chez les lapins hypercholestérolémiques traités au bFGF, alors que 71% sont positifs chez les lapins normaux traités au bFGF. Dans les cellules stimulées, le pourcentage de positivité des cellules est similaire entre les lapins hypercholestérolémiques traités et les lapins normaux traités (71% et 73% respectivement).

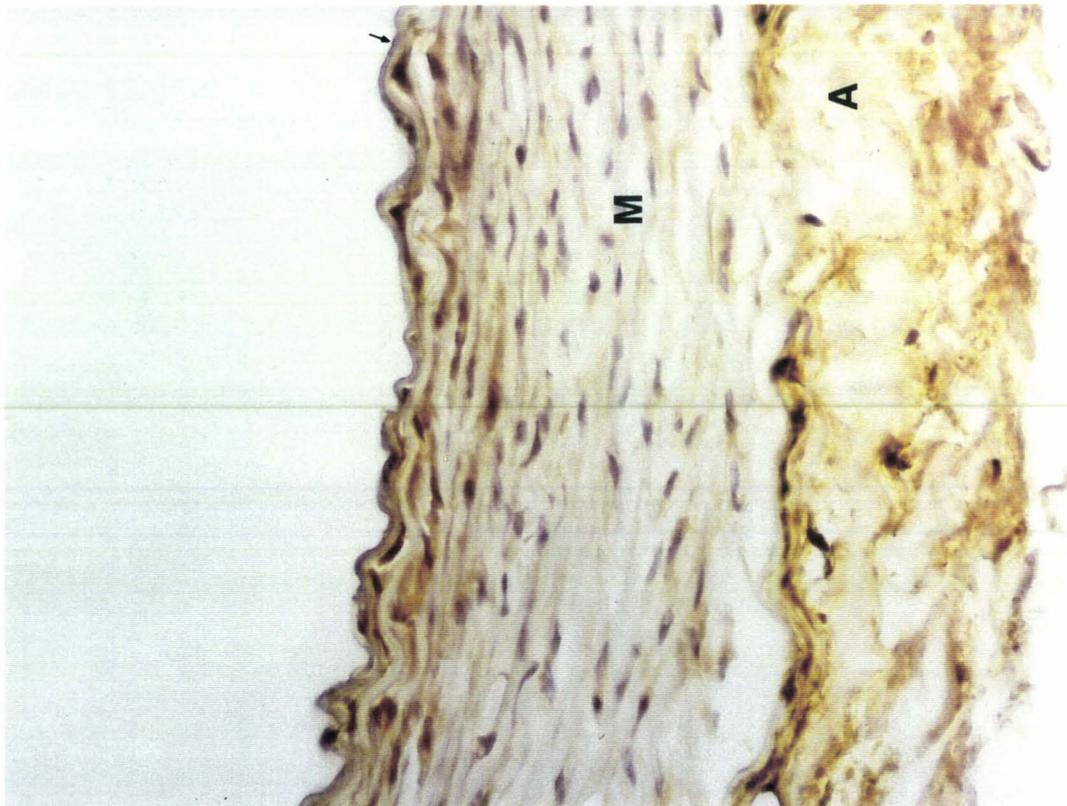
Des coupes tissulaires d'aortes ont été analysées par immunohistochimie afin de détecter la distribution du FT dans la paroi vasculaire après traitement au bFGF chez 5 lapins de chacun des 2 groupes. Le FT est retrouvé dans l'adventice des vaisseaux dans les deux groupes de lapins. Un marquage intense est observé au niveau des CMLs de la média et un marquage plus faible est observé au niveau de l'intima des lapins normaux traités au bFGF (**Figure 21A**). Le FT est faiblement mis en évidence au niveau de la média des vaisseaux des lapins hypercholestérolémiques traités au bFGF. Aucun marquage n'est observé au niveau de l'intima (**Figure 21B**).



B

Figure 21 : Mise en évidence du FT sur une coupe d'artère de lapin normal traité au bFGF (A) ou de lapin hypercholestérolémique traité au bFGF (B).

L'adventice (A), la média (M) sont représentés. L'intima est indiquée par une flèche.



A

V-2-2 Discussion

Les principaux résultats de notre étude montrent que, chez le lapin sain, le bFGF induit une expression du FT dans la paroi vasculaire, au niveau des cellules endothéliales de l'intima et les CMLs de la média. Au niveau des monocytes circulants, on constate aussi une augmentation d'expression du FT, qui n'est pas amplifiée par exposition à l'endotoxine in vitro. Paradoxalement, chez le lapin hypercholestérolémique, le bFGF n'induit qu'une faible expression du FT dans les CMLs, et aucune expression au niveau de l'endothélium. Dans les monocytes sanguins, le bFGF n'induit pas non plus d'expression du FT ; au contraire, cette expression est diminuée par rapport à celle des lapins hypercholestérolémiques non traités. Par contre, la réponse du FT à l'endotoxine in vitro est augmentée. L'effet du bFGF est donc différent selon qu'il est injecté à un lapin normal ou hypercholestérolémique.

Il a été démontré in vivo que le bFGF permettait une réendothélialisation rapide après angioplastie expérimentale ou après athérosclérose induite par un régime hypercholestérolémique. Les cellules régénérées retrouvent une fonction endothéliale normale (301-302). Le bFGF agit à la fois sur la prolifération endothéliale et sur la fonction endothéliale. Cependant, les effets du bFGF peuvent être multiples et son utilisation chez l'homme reste limitée par son rôle dans l'angiogénèse (333) qui pourrait favoriser la prolifération vasculaire pathologique (rétinopathie diabétique, croissance tumorale).

De plus, nos résultats chez le lapin sain montrent que le bFGF augmente l'expression du FT dans les cellules ou celle-ci est inductible. Compte tenu du potentiel procoagulant du FT, ceci pourrait faire craindre un effet thrombogène du FT. In vitro, il avait déjà été démontré que certains facteurs de croissance (PDGF, FGF, TGF β , EGF) induisaient l'expression du FT dans les fibroblastes humains et les CMLs de rat (29,156,303-304). Cette stimulation de l'expression du FT est médiée par les facteurs de transcription Sp1 et Egr-1 (Early Growth Response Gene 1) qui se fixent sur le site SRR du promoteur du gène du FT (9). Il a

également été démontré qu'un traumatisme porté à la paroi vasculaire entraînait l'expression de l'ARNm du FT (74). D'autres travaux ont pu déterminer qu'après ce type de traumatisme, les cellules vasculaires libèrent du bFGF (334). Il semble donc possible qu'une augmentation d'expression du FT survienne dans les cellules à proximité du bFGF libéré.

Nos résultats suggèrent qu'*in vivo*, le bFGF est capable d'induire l'expression du FT au niveau de plusieurs types cellulaires vasculaires. Les conséquences prothrombotiques éventuelles dépendent ensuite de la disponibilité réelle du FT au niveau membranaire. En effet, le FT a été mis en évidence dans des cavéoles de CMLs (38) et de cellules endothéliales (43-44) où il existe sous forme latente. Il faut alors une modification de l'intégrité membranaire pour qu'une redistribution du FT conduise à une augmentation de l'activité procoagulante de ces cellules (31,38). Les techniques que nous avons utilisées ne permettent pas actuellement de préciser si le FT synthétisé peut entrer en contact avec le plasma et en particulier avec le FVII. On peut supposer qu'un processus supplémentaire d'agression vasculaire ou de lyse cellulaire est nécessaire pour que ce contact se produise, et qu'un effet délétère thrombogène apparaisse.

Des propriétés autres que son rôle dans l'initiation de la coagulation peuvent être également envisagées pour le FT vasculaire, en particulier son importance en tant que récepteur dans le processus d'angiogénèse. En effet, le FT participe à la croissance et à la vascularisation de cellules tumorales chez la souris par induction de facteurs angiogéniques tels que le VEGF (80). Très récemment, une étude a démontré que la formation du complexe FT/FVIIa permettait la production du VEGF par des fibroblastes *in vitro* (86). Par son domaine cytoplasmique, le FT favorise aussi la prolifération métastatique (81-82) par un mécanisme nécessitant la fixation du FVIIa au FT (82). Enfin, le FT participe également au processus d'embryogénèse (77-78). Le FT pourrait participer à l'angiogénèse et à la migration des cellules endothéliales et/ou des CMLs par la transduction de signaux cellulaires.

Chez le lapin hypercholestérolémique, l'effet est beaucoup moins important. Ce modèle se rapprochant de l'athérosclérose humaine, il semble possible que l'activation du FT dans les cellules vasculaires après injection de bFGF en pathologie humaine soit plus limitée que ne laissaient supposer les résultats obtenus dans le modèle non hypercholestérolémique.

Les raisons de la faible activation du FT après régime hypercholestérolémique ne sont pas connues. Des observations semblables ont été faites sur des monocytes sanguins de lapin (325) mais également chez l'homme sur des monocytes sanguins de sujets hyperlipémiques (résultats soumis pour publication). L'hypercholestérolémie induit de nombreuses modifications des fonctions monocytaires. Elle favorise l'adhésion des monocytes à l'endothélium et facilite leur migration et leur transformation en cellules spumeuses dans la paroi vasculaire (335). Cependant, nous avons établi que nos résultats ne sont pas liés à une diminution des monocytes circulants. D'autres hypothèses sont envisageables. Des taux lipidiques élevés pourraient modifier la composition phospholipidique des membranes cellulaires et donc diminuer l'activité fonctionnelle du FT ou la fixation des FVII/FVIIa à la surface des monocytes. Ces lipides pourraient également intervenir sur la formation de microvésicules qui favorisent la dissémination de l'activité procoagulante lorsqu'elles sont associées aux monocytes (173). La modification qualitative des phospholipides membranaires pourrait intervenir sur l'activité coagulante de ces microvésicules et modifier l'activité du FT associée aux monocytes. Il a également été démontré que certains lipides comme les LDL inhibaient l'expression du FT (336-337) et que seuls les LDL oxydés et le cholestérol libre augmentaient cette expression (52-54).

Une autre hypothèse serait celle d'une interaction possible entre le cholestérol et les récepteurs membranaires du bFGF. Il existe 4 types de récepteurs pour le bFGF (FGF1 à FGF4), qui par leur structure, sont proches des récepteurs type tyrosine kinase (338-339). Ils sont présents dans les monocytes/macrophages, en particulier le récepteur de haute affinité

FGF2 (340), dans les cellules endothéliales et les CMLs (341). Le bFGF peut également se fixer au niveau de la matrice extracellulaire par sa liaison aux héparanes sulfates (295). Il est stocké dans le cytosol des CMLs, des cellules endothéliales et des monocytes (339,343). Le bFGF, disponible au niveau membranaire, peut donc être libéré après agression cellulaire. L'internalisation du bFGF extracellulaire est rendue possible après fixation à son récepteur, qui n'est pas accessible à l'état physiologique dans les cellules endothéliales et les CMLs (341,344). L'hypercholestérolémie pourrait intervenir sur la fixation du bFGF à son récepteur voire pourrait empêcher l'expression de ces récepteurs. En effet, il semble que l'induction de l'expression des récepteurs est possible par un traumatisme sévère tel que l'angioplastie par ballonnet (341,345). Or, le traumatisme vasculaire chronique observé durant l'athérogénèse reste beaucoup moins important que celui provoqué par le ballonnet.

Nos résultats suggèrent que le bFGF peut participer à l'évolution de l'athérosclérose de manière indirecte par induction de l'expression de FT par les monocytes sanguins et les cellules vasculaires. Le FT jouerait alors un rôle différent de ses propriétés procoagulantes. Il pourrait favoriser la transduction de signaux conduisant à la prolifération cellulaire. Le FT pourrait intervenir directement sur le processus d'angiogénèse et participer à la néovascularisation des plaques athéroscléreuses.

V-3 Effet de l'endotoxine

V-3-1 Résultats

L'injection d'une dose unique d'endotoxine provoque une altération de l'état général des lapins, avec perte de poids importante d'environ 10%, 5 jours après l'injection. L'analyse des gaz du sang après 4 heures montre que les lapins sont en acidose métabolique compensée par une hyperventilation. La seule mortalité observée se situe avant 24 heures et est de 50%.

Etude entre 1 heure et 24 heures

Une heure après l'injection d'endotoxine, nous pouvons observer un effondrement du nombre de leucocytes, du nombre de monocytes ainsi qu'une réduction progressive du nombre de plaquettes. L'hématocrite et le nombre de plaquettes diminue fortement à la 24^{ème} heure, alors que le nombre de leucocytes et le nombre de monocytes augmentent progressivement (**Figure 22**). Les facteurs de la coagulation diminuent de façon progressive et significative excepté le fibrinogène. Une tendance à l'augmentation est observée à la 24^{ème} heure pour tous les facteurs y compris pour le fibrinogène (**Tableau VII**).

Etude entre 5 jours (J5) et 21 jours (J21)

Cinq jours après l'injection d'endotoxine, le nombre de leucocytes, le nombre de monocytes et le nombre de plaquettes augmentent de façon significative par rapport au contrôles avant injection (J0) pour atteindre leur maximum après 7 jours (J7). Seul l'hématocrite continue de baisser (**Figure 23**). Les facteurs de la coagulation augmentent tous aussi y compris le fibrinogène pour atteindre leur maximum à J7 (**Tableau VIII**). Dès 14 jours (J14), l'ensemble de ces paramètres diminue de nouveau.

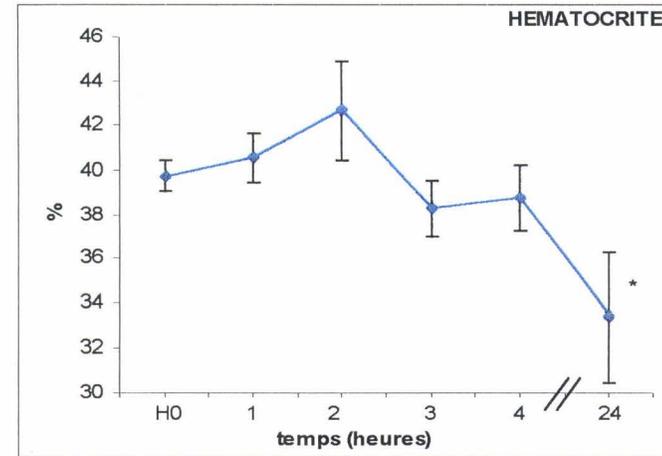
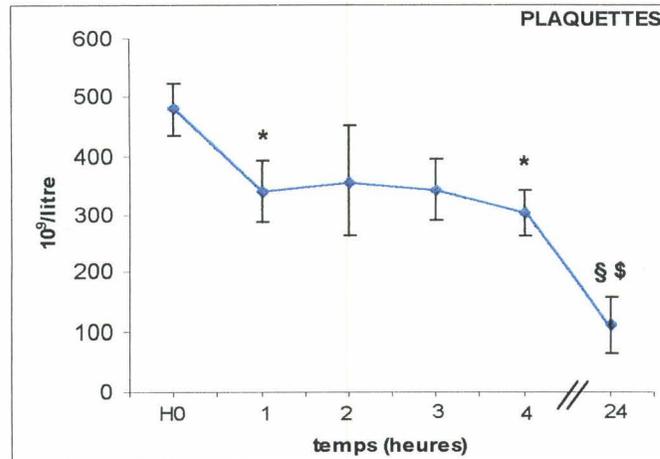
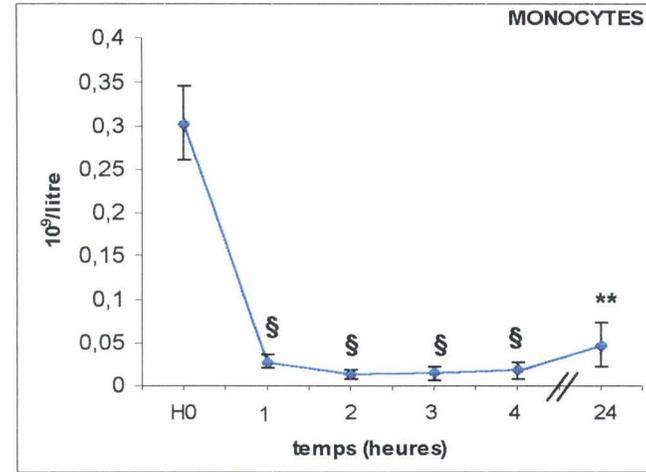
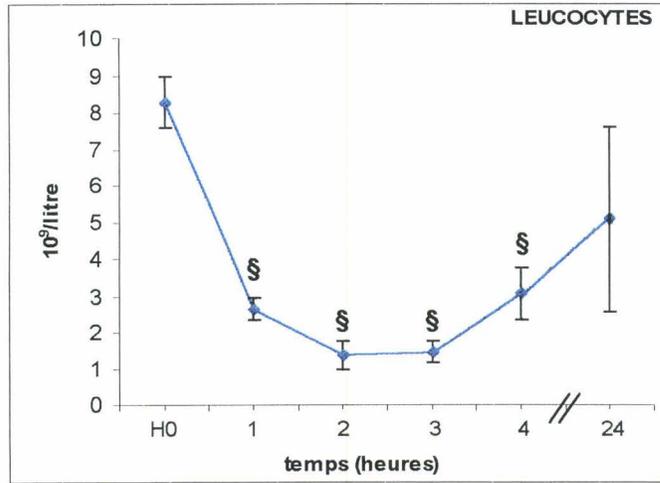


Figure 22 : Effet de l'injection d'une dose unique d'endotoxine sur le nombre de leucocytes, le nombre de monocytes, le nombre de plaquettes et l'hématocrite. Variation en fonction du temps.

n=12 à J0, n=10 à 1h, n=5 à 2h, 3h, 4h et 24h

* p<0,05 versus H0 ; ** p<0,005 versus H0 ; § p<0,0005 versus H0 ; \$ p<0,05 versus 4 heures

	TP %	F II %	F V %	F VII+X %	Fibrinogène g/litre
H0 n=12	92 ± 3	98 ± 5	109 ± 11	108 ± 7	4,1 ± 0,3
1 heure n=10	79 ± 6*	101 ± 15	85 ± 13	99 ± 7	3,8 ± 0,3
2 heures n=5	59 ± 7§	72 ± 14*	67 ± 17*	78 ± 16	3,7 ± 0,3
3 heures n=5	42 ± 11§	49 ± 14**	45 ± 14*	56 ± 16**	3,7 ± 0,5
4 heures n=5	53 ± 4§	70 ± 2**	52 ± 4**	65 ± 7**	3,3 ± 0,2
24 heures n=5	64 ± 6**	57 ± 5**	34 ± 5**	76 ± 5*	5,1 ± 0,8

Tableau VII : Effet de l'injection d'une dose unique d'endotoxine sur les facteurs de coagulation. Variation en fonction du temps.

*p<0,05 versus H0 **p<0,005 versus H0 §p<0,0005 versus H0.

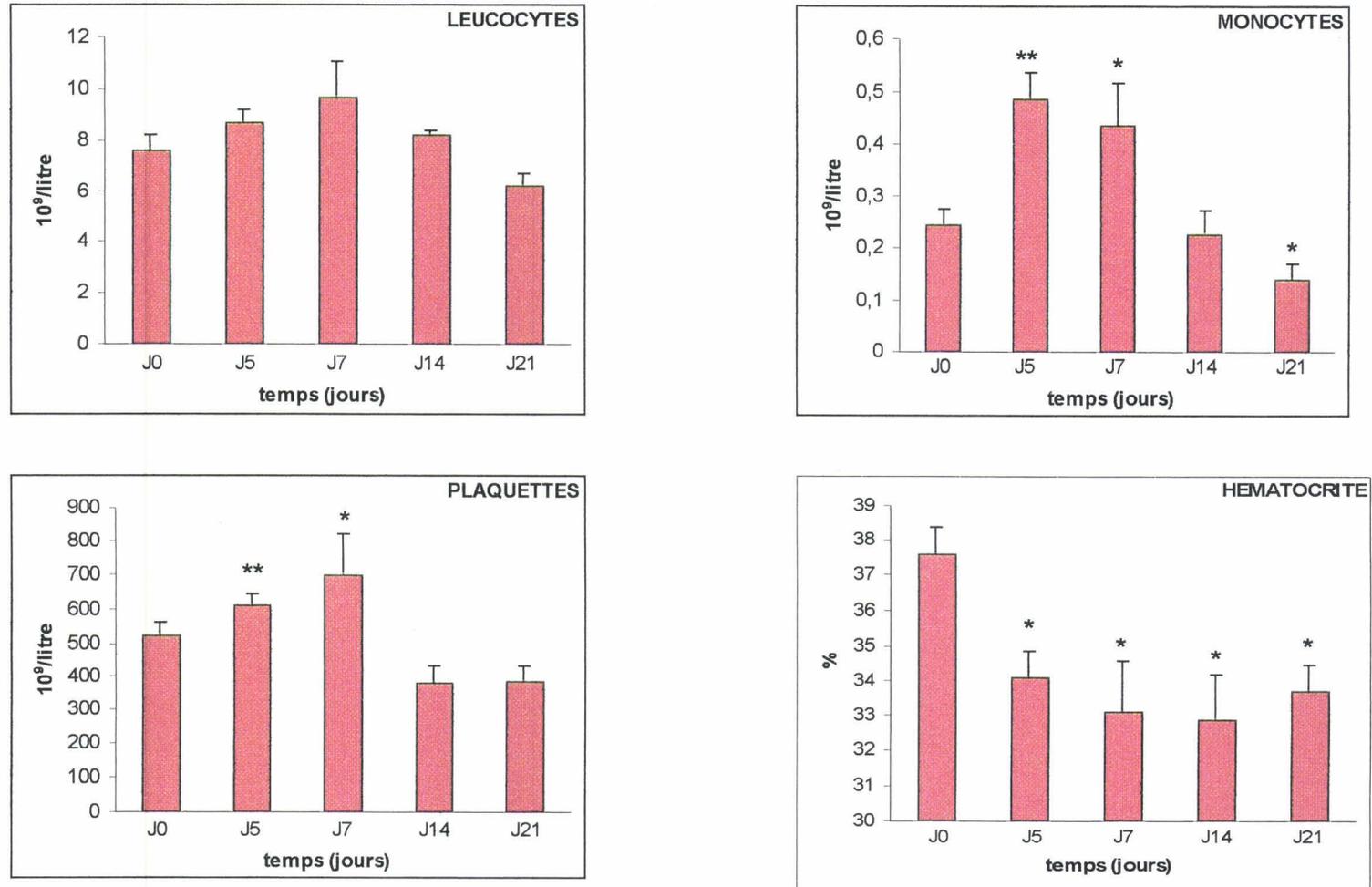


Figure 23 : Effet de l'injection d'une dose unique d'endotoxine sur le nombre de leucocytes, le nombre de monocytes, le nombre de plaquettes et l'hématocrite. Variation en fonction du temps.

n=16 à J0 et J5, n=7 à J7, J14 et J21. * p<0,05 versus J0 ** p<0,005 versus J0.

	TP %	F II %	F V %	F VII+X %	Fibrinogène g/litre
J0 n=16	95 ± 3	100 ± 5	126 ± 10	105 ± 6	3,9 ± 0,2
J5 n=16	102 ± 3	132 ± 6**	175 ± 12**	142 ± 7§	6,7 ± 0,4§
J7 n=7	85 ± 7	136 ± 14*	177 ± 27*	140 ± 15*	8,6 ± 2,3*
J14 n=7	106 ± 4	103 ± 8	135 ± 20	106 ± 13	4,7 ± 0,9
J21 n=7	91 ± 3	101 ± 5	119 ± 9	88 ± 6	3,0 ± 0,4*

Tableau VIII : Effet de l'injection d'une dose unique d'endotoxine sur les facteurs de coagulation. Variation en fonction du temps.

* p<0,05 versus J0 ** p<0,005 versus J0

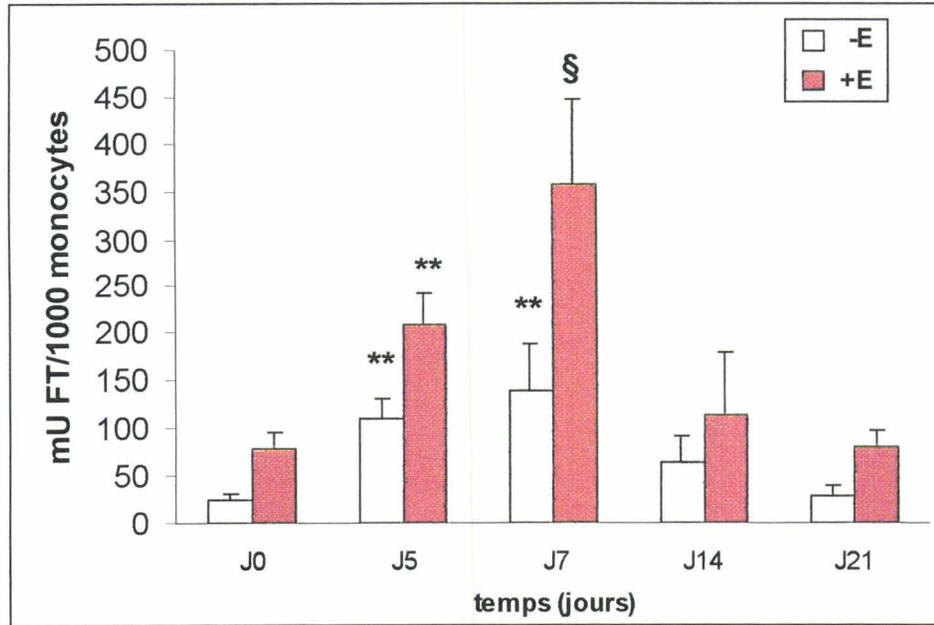
L'analyse de l'expression du FT monocyttaire a été réalisée entre le 5^{ème} jour et le 21^{ème} jour. En effet, les prélèvements de sang entre 1 heure et 24 heures n'étaient pas assez importants pour isoler suffisamment de cellules nécessaires à la technique.

Dans les cellules non stimulées (-E), l'expression de FT est augmentée de façon significative à J5 (110 ± 21 versus 25 ± 7 mU FT/1000 monocytes à J0, $p < 0,005$) et augmente encore à J7 (140 ± 49 mU FT/1000 monocytes, $p < 0,005$ versus J0). L'expression de FT se normalise ensuite progressivement (65 ± 28 mU FT/1000 monocytes à J14 et 30 ± 10 mU FT/1000 monocytes à J21) (**Figure 24A**).

Dans les cellules stimulées (+E), l'activité FT augmente de façon significative à J5 et à J7 (209 ± 34 mU FT/1000 monocytes à J5 ; 358 ± 90 mU FT/1000 monocytes à J7 versus 80 ± 17 mU FT/1000 monocytes à J0, $p < 0,005$ et $p < 0,0005$ respectivement). La réponse à l'endotoxine in vitro est donc encore plus élevée que la réponse in vivo. L'expression se normalise ensuite (115 ± 65 mU FT/1000 monocytes à J14 et 81 ± 17 mU FT/1000 monocytes à J21). Les résultats sont similaires lorsqu'ils sont exprimés par millilitre de sang (**Figure 24B**).

L'analyse des coupes tissulaires montrent que 4 heures après l'injection d'endotoxine, le FT est exprimé par les CMLs de la média et par les cellules endothéliales de l'intima (**Figure 25A**), comme le montre l'intensité du marquage. Nous pouvons également observer une forte intensité de marquage à J5 (**Figure 25B**).

A



B

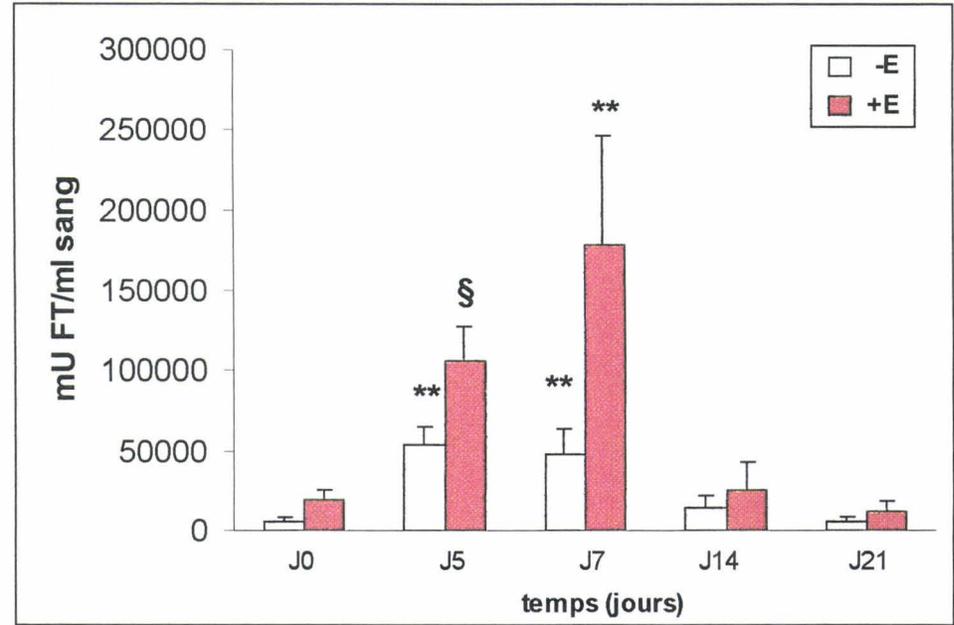


Figure 24 : Effet de l'injection d'une dose unique d'endotoxine sur l'expression de FT monocyttaire. Variation en fonction du temps.

Les histogrammes non colorés correspondent aux cellules cultivées sans endotoxine (-E), les histogrammes colorés correspondent aux cellules cultivées avec de l'endotoxine (+E). Les résultats sont exprimés en mU de FT pour 1000 monocytes (A) ou en mU de FT par ml de sang (B).

n=16 à J0 et J5, n=7 à J7, J14 et J21. ** p<0,005 versus J0

§ p<0,0005 versus J0.

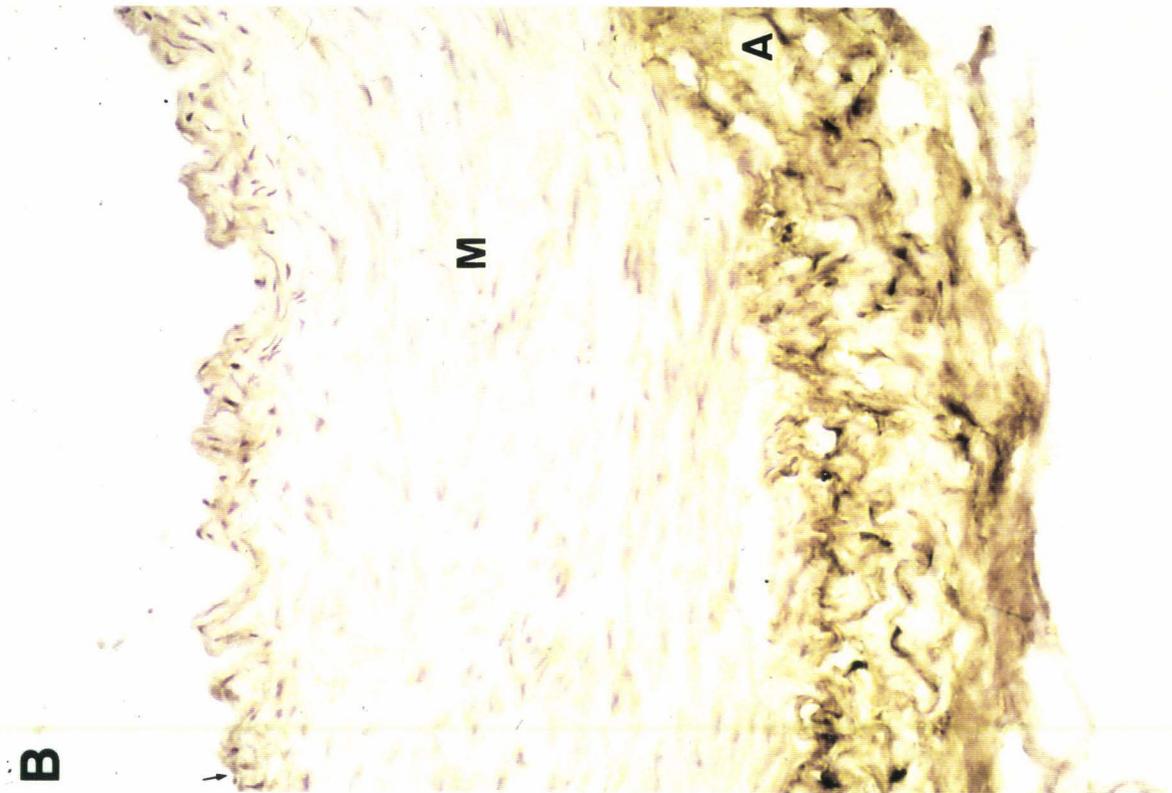
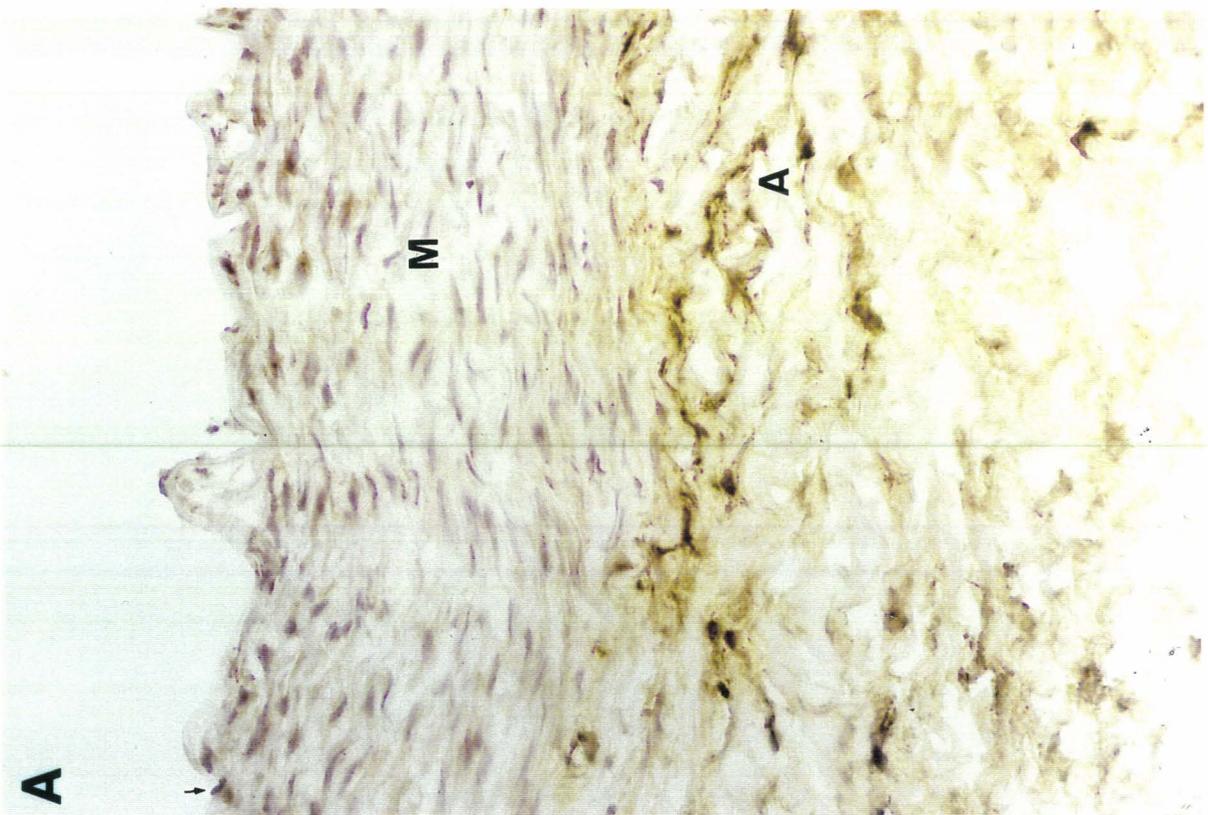


Figure 25 : Mise en évidence du FT sur une coupe d'artère de lapin après injection d'une dose unique d'endotoxine.

Une coupe d'artère 4 heures après l'injection est représentée en A. En B est représentée une coupe d'artère 5 jours après l'injection.

L'adventice (A), la média (M) sont représentés. L'intima est indiquée par une flèche. Le marquage est intense en A et en B pour l'ensemble de l'artère.



V-3-2 Discussion

Nos résultats déterminés durant les premières 24 heures confirment ceux obtenus par d'autres équipes chez le lapin et chez le babouin (236,241). Nous avons observé une baisse généralisée des paramètres étudiés, en particulier une leucopénie, une diminution du nombre de monocytes, une réduction progressive du nombre de plaquettes ainsi qu'une diminution des facteurs de la coagulation excepté pour le fibrinogène.

Nos principaux résultats démontrent un état procoagulant prolongé une semaine après l'injection d'une dose unique d'endotoxine, alors que les manifestations cliniques du choc endotoxinique ont disparu. Cet état est médié par l'expression de FT dans les monocytes sanguins, les cellules endothéliales de l'intima et les CMLs de la média. De plus, la réponse des monocytes sanguins à la stimulation in vitro par l'endotoxine est encore augmentée par rapport aux cellules non stimulées. Les paramètres physiologiques associés à la coagulation qui ont été étudiés sont également très élevés. Après 14 jours, l'expression de FT diminue et se stabilise après 21 jours à des valeurs normales. Les autres paramètres diminuent dans le même temps.

L'injection d'endotoxine induit rapidement la synthèse de différentes cytokines en particulier le TNF α et l'IL-1 β . Ces cytokines sont capables d'induire in vitro l'expression de FT par les monocytes et les cellules endothéliales (46-47,63). Nous avons pu constater une hémolyse se produisant à partir de la 24^{ème} heure suivant l'injection d'endotoxine et qui se prolonge dans le temps. Cette hémolyse conduit à la génération d'hémoglobine libre. Or, il a été démontré in vitro que l'hémoglobine libre pouvait former un complexe avec l'endotoxine et amplifier l'expression de FT des cellules endothéliales stimulées par l'endotoxine (65). L'hémolyse produite après l'injection d'endotoxine pourrait par une boucle d'amplification augmenter l'expression de FT par les monocytes et les cellules vasculaires. Cette amplification est également possible par la production de PAF par les cellules activées. En

effet, comme nous l'avons montrée dans une étude précédente, le PAF est capable d'amplifier l'expression de FT par les monocytes et les cellules endothéliales stimulées in vitro par de l'endotoxine (346). L'injection d'endotoxine et le processus inflammatoire qui en découle sont liés au processus d'apoptose. En effet, l'endotoxine provoque la mort des cellules endothéliales d'aorte de rat (347). Le TNF α provoque également la mort cellulaire in vitro (348). Or, l'apoptose est associée à un état procoagulant sans doute par l'altération des membranes cellulaires (67,209-210) ce qui pourrait expliquer cette expression de FT prolongée à J5 au niveau des cellules endothéliales et des CMLs des artères de lapin. Les monocytes sont également capables de disséminer l'activité procoagulante en libérant des vésicules contenant du FT en grande quantité et des protéines d'adhésion qui leur permettent de se fixer et d'activer les cellules endothéliales (173). De plus, ce processus est amplifié par l'endotoxine (174). Un marquage histochimique des artères nous confirmerait la présence ou non de ces vésicules.

L'infection bactérienne, par la prolongation de l'état procoagulant des monocytes circulants et des cellules vasculaires, pourrait jouer un rôle important dans l'athérosclérose. De plus, ces effets à distance sont à surveiller, car nous avons observé un effet « mémoire » des monocytes qui lors de la stimulation in vitro par l'endotoxine expriment encore plus de FT. L'expression de FT par les cellules vasculaires et les monocytes pourraient donc être beaucoup plus importante à la suite d'une seconde infection rapprochée.

V PUBLICATIONS

D. Corseaux, T. Le Tourneau, I. Six, M.D. Ezekowitz, E.P. McFadden, T. Meurice, P. Asseman, C. Bauters, B. Jude.

Enhanced monocyte tissue factor response after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. Inhibition with dietary L-arginine.

Circulation 1998; soumis.

B. Agraou, D. Corseaux, E.P. McFadden, A. Bauters, A. Cosson, B. Jude.

Effects of coronary angioplasty on monocyte tissue factor response in patients with stable or unstable angina.

Thrombosis Research 1997;88:237-243.

B. Jude, V. Gaveriaux, D. Corseaux.

Facteur tissulaire et maladie coronaire.

Sang Thrombose Vaisseaux 1996;8:629-634.

T. Meurice, C. Bauters, B. Vallet, D. Corseaux, E. Van Belle, M. Hamon, B. Dupuis, J-M. Lablanche, M.E. Bertrand.

Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta.

American Journal of Physiology 1996;272:H613-H617.

D. Corseaux, T. Le Tourneau, I. Six, M.D. Ezekowitz, T. Meurice, C. Bauters, B. Jude.

L-arginine reduces monocyte tissue factor activity after angioplasty in hypercholesterolemic rabbits.

Circulation 1997;96:I-41 (communication orale 70th American Heart Association, Orlando, 1997)

I. Six, E. Van Belle, R. Bordet, D. Corseaux, T. Meurice, B. Dupuis, C. Bauters, M.E. Bertrand.

Nitric oxide is not involved in endothelial regrowth in-vivo : results in a rabbit balloon injury model.

Circulation 1997;96:I-552.

T. Le Tourneau, C. Bauters, D. Corseaux, G. Lebuffe, E. Van Belle, B. Dupuis, J.M. Lablanche, M.E. Bertrand.

Role of nitric oxide in neointimal hyperplasia and vascular remodeling after experimental angioplasty.

European Heart Journal 1997;18:501.

D. Corseaux, T. Meurice, I. Six, C. Bauters, B. Jude.

Significant increase of monocyte tissue factor expression by bFGF infusion in rabbits fed an atherogenic diet.

British Journal of Haematology 1996;93(suppl 2):15.

D. Corseaux, T. Meurice, I. Six, C. Bauters, B. Dupuis, B. Jude.

Augmentation significative de l'expression du facteur tissulaire monocyttaire par l'injection de bFGF chez des lapins mis sous régime athérogène.

Communication orale, Groupe d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose 1996, Paris.

D. Corseaux, J. Leclerc, Q. Pu, R. Bordet, B. Jude, B. Vallet.
Cinétique d'expression du facteur tissulaire au cours du choc endotoxinique chez le lapin.
Congrès de la Société de Réanimation de Langue Française, Paris, 1998.

D. Corseaux, C. Decoene, I. Six, B. Vallet, B. Jude.
Persistence of monocyte tissue factor expression after *Escherichia coli* sepsis in rabbits.
Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997;90:521.

J-M. Herbert, D. Corseaux, A. Lalé, A. Bernat.
Hypoxia primes endotoxin-induced tissue factor expression in human monocytes and endothelial cells by PAF-dependent mechanisms.
Journal of Cellular Physiology 1996;169:290-299.

CONCLUSION

Le FT est l'activateur le plus puissant de la coagulation connu à ce jour favorisant son initiation. L'exposition intravasculaire de FT pourrait participer à l'évolution de processus pathologiques et de façon active à l'initiation ou au développement d'une thrombose.

Le modèle expérimental que nous avons choisi se rapproche de la pathologie humaine et nous a permis de mettre en évidence la modulation d'expression du FT monocytaire et vasculaire par différents produits susceptibles d'être utilisés en prévention du processus d'athérosclérose. Or, la modulation pharmacologique peut avoir des effets contradictoires. Ainsi, le bFGF, favorisant la réendothélialisation fonctionnelle, peut d'un autre côté augmenter le potentiel thrombogène de ces cellules. D'autres agents déjà utilisés en pathologie vasculaire tels que l'aspirine, les statines ou des inhibiteurs de l'angiotensine II pourraient également influencer sur l'expression cellulaire du FT et donc moduler le potentiel thrombogène de ces cellules. Si l'une de ces hypothèses se confirmait, ceci apporterait un éclairage nouveau sur leur mode d'action connus ou supposés bénéfiques dans la prévention des accidents aigus de l'athérosclérose, et ouvrirait la porte à de nouveaux rationnels d'utilisation, voire de modulation de posologie, ou au développement d'agents spécifiquement actifs sur cet aspect nouveau de la pathologie vasculaire artérielle. Ainsi, le FT et le complexe FT/FVII seront probablement une des cibles des traitements antithrombotiques futurs par la modulation d'expression ou par modification de l'activité FT.

Il faut également tenir compte des autres propriétés du FT et en particulier son rôle dans l'angiogénèse. Il pourrait participer à la prolifération cellulaire et à la néovascularisation des plaques athéroscléreuses soit par un effet direct soit par transduction d'un signal en tant que récepteur. Le FT pourrait aussi jouer un rôle capital dans le processus de cancérogénèse. Il semble donc nécessaire d'approfondir nos connaissances sur ses fonctions potentielles, différentes de son rôle d'initiateur de la cascade de la coagulation.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- **O'Brien DP.** The molecular biology and biochemistry of tissue factor. *In Bailliere's Clinical Haematology*. 1989;2:801-820.
- 2- **Bach R., Nemerson Y., Konigsberg W.** Purification and characterization of bovine tissue factor. *J. Biol. Chem.* 1981;256:8324-8331.
- 3- **Broze G., Leykman J., Schwartz B., Miletich J.** Purification of human brain tissue factor. *J. Biol. Chem.* 1985;260:10917-10920.
- 4- **Fischer KL., Gorman C., Vehar G., O'Brien DP., Lawn RM.** Cloning and expression of tissue factor cDNA. *Thromb. Res.* 1987;48:89-99.
- 5- **Morrissey JH., Fakhrai H., Edgington TS.** Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell.* 1987;50:129-135.
- 6- **Scarpatti EM., Wen D., Broze G., Miletich J., Flandermeyer RR., Siegel NR., Sadler JE.** Human tissue factor: cDNA sequence and chromogen localization of the gene. *Biochemistry.* 1987;26:5234-5238.
- 7- **Spicer EK., Horton R., Bloem L., Bach R., Williams KR., Guha A., Kraus J., Lin TC., Nemerson Y., Konigsberg WH.** Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987;84:5148-5152.
- 8- **Carson SD., Henry WM., Shows TB.** Tissue factor gene localized to human chromosome 1 (1pter-1p21). *Science.* 1985;229:991-993.
- 9- **Mackman N., Morrissey JH., Fowler B., Edgington TS.** Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor, that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry.* 1989;25:1755-1762.
- 10- **Ruf W., Edgington TS.** Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB. J.* 1994;8:385-390.
- 11- **Rehemtulla A., Ruf W., Edgington TS.** The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is required for binding of factor VII. *J. Biol. Chem.* 1991;266:10294-10299.
- 12- **Nemerson Y.** Tissue factor and hemostasis. *Blood.* 1988;71:1-8.
- 13- **Bazan JF.** Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990;87:6934-6938.

- 14- **Harlos K., Martin DMA., O'Brien DP., Jones EY., Stuart DL., Polikarpov I., Miller A., Tuddenham EGD., Boys CWG.** Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. *Nature*. 1994;370:662-666.
- 15- **Muller AY., Ultsch MH., Kelley RF., De Vos AM.** Structure of the extracellular domain of human tissue factor: location of the factor VIIa binding site. *Biochemistry*. 1994;33:10864-10870.
- 16- **Martin DM., Boys WG., Ruf W.** Tissue factor: molecular recognition and cofactor function. *FASEB. J.* 1995;9:852-859.
- 17- **Kelley RF., Costas KE., O'Connell MP., Lazarus RA.** Analysis of the factor VIIa binding site on human tissue factor: effects of tissue factor mutations on the kinetics and thermodynamics of binding. *Biochemistry*. 1995;34:10383-10392.
- 18- **Ruf W., Schullek JR., Stone MJ., Edgington TS.** Mutational mapping of functional residues in tissue factor: identification of factor VII recognition determinants in both structural modules of the predicted cytokine receptor homology domain. *Biochemistry*. 1994;33:1565-1572.
- 19- **Huang Q., Neuenschwander PF., Rezaie AR., Morrissey JH.** Substrate recognition by tissue factor-factor VIIa. Evidence for interaction of residues Lys165 and Lys166 of tissue factor with the 4-carboxyglutamate-rich domain of the factor X. *J. Biol. Chem.* 1996;271:21752-21757.
- 20- **Banner DW., Darcy A., Chene C., Winkler FK., Guha A., Konigsberg WH., Nemerson Y., Kirchhofer D.** The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature*. 1996;380:41-46.
- 21- **Neuenschwander PF., Fiore MM., Morrissey JH.** Factor VII autoactivation proceeds via interaction of distinct protease-cofactor and zymogen-cofactor complexes. Implications of a two-dimensional enzyme kinetic mechanism. *J. Biol. Chem.* 1993;268:21489-21492.
- 22- **Wildgoose P., Nemerson Y., Hansen LL., Nielsen FE., Glazer S., Hedner U.** Measurement of basal levels of factor VIIa in hemophilia A and B patients. *Blood*. 1992;80:25-28.
- 23- **Rao LV., Hoang AD.** Purification and characterization of rabbit tissue factor. *Thromb. Res.* 1989;56:109-118.

- 24- **Pawashe AB., Ezekowitz MD., Lin TC., Horton R., Bach R., Konigsberg WK.** Molecular cloning, characterization and expression of cDNA for rabbit brain tissue factor. *Thromb. Haemost.* 1991;66:315-320.
- 25- **Drake TA., Morrissey JH., Edgington TS.** Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. *Am. J. Pathol.* 1989;134:1087-1097.
- 26- **Wilcox JN., Smith KM., Schwartz SM., Gordon D.** Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989;86:2839-2843.
- 27- **Moore KL., Andreaoli SP., Esmon NL., Esmon CT., Bang NU.** Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J. Clin. Invest.* 1987;79:124-130.
- 28- **Prydz H., Allison AC.** Tissue thromboplastin activity of isolated human monocytes. *Thromb. Haemost.* 1978;39:582-591.
- 29- **Taubman MB., Marmur JD., Rosenfield CL., Guha A., Nichtberger S., Nemerson Y.** Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation. *J. Clin. Invest.* 1993;91:547-552.
- 30- **Maynard JR., Dreyer BE., Stemerman MB., Pitlick FA.** Tissue-factor coagulant activity of cultured human endothelial and smooth muscle cells and fibroblasts. *Blood.* 1977;50:387-396.
- 31- **Bach R., Rifkin DB.** Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990;87:6995-6999.
- 32- **Bach RR., Moldow CF.** Mechanism of tissue factor activation on HL-60 cells. *Blood.* 1997;89:3270-3276.
- 33- **Fair DS., MacDonald MJ.** Cooperative interaction between factor VII and cell surface-expressed tissue factor. *J. Biol. Chem.* 1987;262:11692-11698.
- 34- **Le DT., Rapaport SI, Rao LVM.** Relations between factor VIIa binding and expression of factor VIIa/tissue factor catalytic activity on cell surfaces. *J. Biol. Chem.* 1992;267:15447-15454.
- 35- **Rao LVM., Robinson T., Hoang AD.** Factor VIIa/tissue factor-catalysed activation of factors IX and X on a cell surface and in suspension: a kinetic study. *Thromb. Haemost.* 1992;67:654-659.

- 36- **Drake TA., Ruf W., Morrissey JH., Edgington TS.** Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J. Cell. Biol.* 1989;109:389-395.
- 37- **Broze GJ., Girard TJ., Novotny WF.** The lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Prog. Hemost. Thromb.* 1991;10:243-268.
- 38- **Mulder AB., Smit JW., Bom VJJ., Blom NR., Ruiters MHJ., Ruud Halie M., van der Meer J.** Association of smooth muscle cell tissue factor with caveolae. *Blood.* 1996;88:1306-1313.
- 39- **Mulder AB., Karin SM., Heggepaping KSM., Magielse CPE., Blom NR., Smit JW., Vandermeer J., Halie MR., Bom VJJ.** Tumor necrosis factor α -induced endothelial tissue factor is located on the cell surface rather than in the subendothelial matrix. *Blood.* 1994;84:1559-1566.
- 40- **Kirchhofer D., Tschopp TB., Hadvary P., Baumgartner HR.** Endothelial cells stimulated with tumor necrosis factor- α express varying amounts of tissue factor resulting in inhomogeneous fibrin deposition in a native blood flow system. *J. Clin. Invest.* 1994;93:2073-2083.
- 41- **Narahara N., Enden T., Wiüger M., Prydz H.** Polar expression of tissue factor in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler. Thromb.* 1994;14:1815-1820.
- 42- **Camerer E., Pringle S., Skartlien AH., Wiüger M., Prydz K., Kolsto A-B., Prydz H.** Opposite sorting of tissue factor in human umbilical vein endothelial cells and Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Blood.* 1996;88:1339-1349.
- 43- **Mulder AB., Smit JW., Bom VJJ., Blom NR., Ruud Halie M., van der Meer J.** Association of endothelial tissue factor and thrombomodulin with caveolae. *Blood.* 1996;88:3667-3670.
- 44- **Sevinsky JR., Rao LVM., Ruf W.** Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: a mechanism for regulating cell surface proteolysis of the tissue factor-dependent coagulation pathway. *J. Cell. Biol.* 1996;133:293-304.
- 45- **Osterud B., Olsen JO., Benjaminsen AW.** The role of complement in the induction of thromboplastin synthesis. *Haemostasis.* 1984;14:386-392.
- 46- **Carlsen E., Flatmark A., Prydz H.** Cytokine-induced procoagulant activity in monocytes and endothelial cells. Further enhancement by cyclosporine. *Transplantation.* 1988;46:575-580.

- 47- **Herbert J-M., Savi P., Laplace M-Cl., Lale A.** IL-4 inhibits LPS-, IL1 β , TNF α -induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes. *FEBS. Lett.* 1992;310:31-33.
- 48- **Osterud B., Olsen JO., Wilsgard L.** Mechanisms of endotoxin stimulation of monocytes in whole blood. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990;256:389-399.
- 49- **De Prost D.** Production du facteur tissulaire par les monocytes en réponse à l'endotoxine. Implications pour le traitement du choc septique. *STV.* 1993;5:225-231.
- 50- **Miserez R., Jungi T.** LPS-induced, but not interferon-gamma-induced procoagulant activity of suspended human macrophages is followed by a refractory state of low procoagulant expression. *Thromb. Res.* 1992;65:733-744.
- 51- **Scheibenbogen C., Moser H., Krause S., Andreesen R.** Interferon-gamma-induced expression of tissue factor activity during human monocyte to macrophage maturation. *Haemostasis.* 1992;22:173-178.
- 52- **Lesnik P., Rouis M., Skarlatos S., Fruth HS., Chapman MJ.** Uptake of exogenous free cholesterol induces upregulation of tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:10370-10374.
- 53- **Schuff-Werner P., Claus G., Armstrong VW., Kostering H., Seidel D.** Enhanced procoagulatory activity (PCA) of human monocytes/macrophages after in vitro stimulation with chemically modified LDL. *Atherosclerosis.* 1989;78:109-112.
- 54- **Brand K., Banka CL., Mackman N., Terkeltaub RA., Fan S-T., Curtiss LK.** Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes. *Arterioscler. Thromb.* 1994;14:790-797.
- 55- **Celi A., Pellegrini G., Lorenzet R., De Blasi A., Ready N., Furie BC., Furie B.** P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91:8767-8771.
- 56- **Sissener Engstad C., Lia K., Rekdal O., Olsen JO., Osterud B.** A novel biological effect of platelet factor 4 (PF4): enhancement of LPS-induced tissue factor activity in monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 1995;58:575-581.
- 57- **Osterud B.** Platelet activating factor enhancement of lipopolysaccharide-induced tissue factor activity in monocytes: requirements of platelets and granulocytes. *J. Leukoc. Biol.* 1992;51:462-465.
- 58- **Slungaard A., Key NS.** Platelet factor 4 stimulates thrombomodulin protein C-activated cofactor activity. A structure-function analysis. *J. Biol. Chem.* 1994;269:25549-25556.

- 59- **Lawson CA., Yan SD., Liao H., Zhou YS., Sobel J., Kisiel W., Stern DM.** Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *J. Clin. Invest.* 1997;99:1729-1738.
- 60- **Levy GA., Schwartz BS., Edgington TS.** The kinetics and metabolic requirements for direct lymphocyte induction of human procoagulant monokines by bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 1981;127:357-363.
- 61- **Halvorsen H., Olsen JO., Osterud B.** Granulocyte enhance LPS-induced tissue factor activity in monocytes via an interaction with platelets. *J. Leukoc. Biol.* 1993;54:275-282.
- 62- **Gertler JP., Abbott WM.** Prothrombotic and fibrinolysis function of normal and perturbed endothelium. *J. Surg. Research.* 1992;52:89-95.
- 63- **Bevilacqua MP., Pober JS., Majeau GR., Fiers W., Cotran RS., Gimbrone MA., Jr.** Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986;83:4533-4537.
- 64- **Archipoff G., Beretz A., Freyssinet JM., Klein-Soyer C., Brisson C., Cazenave JP.** Heterogeneous regulation of constitutive thrombomodulin or inducible tissue factor activities on the surface of human saphenous-vein endothelial cells in culture following stimulation by interleukin-1, tumor necrosis factor, thrombin or phorbol ester. *Biochemistry.* 1991;273:679-684.
- 65- **Roth RI.** Hemoglobin enhances the production of tissue factor by endothelial cells in response to bacterial endotoxin. *Blood.* 1994;83:2860-2865.
- 66- **Contrino J., Goralnick S., Qi J., Hair G., Rickles FR., Kreutzer DL.** Fibrin induction of tissue factor expression in human vascular endothelial cells. *Circulation.* 1997;96:605-613.
- 67- **Bombeli T., Karsan A., Tait JF., Harlan JM.** Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood.* 1997;89:2429-2442.
- 68- **Weiss HJ., Turitto VT., Baumgartner HR., Nemerson Y., Hoffmann T.** Evidence for the presence of tissue factor activity on subendothelium. *Blood.* 1989;73:968-975.
- 69- **Lewis JC., Jones NL., Hermanns MI., Rohrig O., Klein CL., Kirkpatrick CJ.** Tissue factor expression during cocultures of endothelial cells and monocytes. *Exp. Mol. Pathol.* 1995;62:207-218.
- 70- **Lo SK., Cheung A., Zheng Q., Silverstein RL.** Induction of tissue factor on monocytes by adhesion to endothelial cells. *J. Immunol.* 1995;154:4768-4777.

- 71- **Collins PW., Noble KE., Reittie JR., Hoffbrand AV., Pasi KJ., Yong KL.** Induction of tissue factor expression in human monocyte/endothelium cocultures. *Br. J. Haematol.* 1995;91:963-970.
- 72- **Napoleone E., Di Santo A., Lorenzet R.** Monocytes upregulate endothelial cell expression of tissue factor: a role for cell-cell contact and cross-talk. *Blood.* 1997;89:541-549.
- 73- **Schechter AD., Giesen PLA., Taby O., Rosenfield C-L., Rossikhina M., Fyfe BS., Kohtz DS., Fallon JT., Nemerson Y., Taubman MB.** Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. *J. Clin. Invest.* 1997;100:2276-2285.
- 74- **Marmur JD., Rossikhina M., Guha A., Fyfe B., Friedrich V., Mendlowitz M., Nemerson Y., Taubman MB.** Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. *J. Clin. Invest.* 1993;91:2253-2259.
- 75- **Sato Y., Asada Y., Marutsuka K., Hatakeyama K., Sumiyoshi A.** Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells. *Thromb. Haemost.* 1996;75:389-392.
- 76- **Xuereb JM., Sié P., Boneu B., Constans J.** Up-regulation of tissue factor expression by platelet-derived growth factor in human vascular smooth muscle cells in culture. Role of mitogen-activated protein kinase and effects of intracellular cyclic AMP. *Thromb. Haemost.* 1997;78:1520-1526.
- 77- **Carmeliet P., Mackman N., Moons L., Luther T., Gressens P., Van Vlaenderen I., Demunck H., Hasper M., Breier G., Evrard P., Müller M., Risau W., Edgington T., Collen D.** Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature.* 1996;383:73-75.
- 78- **Toomey JR., Kratzer KE., Lasky NM., Stanton JJ., Broze GJ.** Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood.* 1996;88:1583-1587.
- 79- **Rosen ED., Chan JC., Idusogie E., Clotman F., Vlasuk G., Luther T., Jalbert LR., Albrecht S., Zhong L., Lissens A., Schoonjans L., Moons L., Castellino FJ., Carmeliet P.** Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature.* 1997;390:290-294.
- 80- **Zhang Y., Deng Y., Luther T., Müller M., Ziegler R., Waldherr R., Stern DM., Nawroth PP.** Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* 1994;94:1320-1327.

- 81- **Bromberg ME., Konigsberg WH., Madison JF., Pawashe A., Garen A.** Tissue Factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;92:8205-8209.
- 82- **Mueller BM., Ruf W.** Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor dependent experimental metastasis. *J. Clin. Invest.* 1998;101:1372-1378.
- 83- **Masuda M., Nakamura S., Murakami T., Komiyama Y., Takahashi H.** Association of tissue factor with a gamma chain homodimer of the IgE receptor type I in cultured human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 1996;26:2529-2532.
- 84- **Rottingen J-A., Enden T., Camerer E., Iversen J-G., Prydz H.** Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca^{2+} signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor. *J. Biol. Chem.* 1995;270:4650-4660.
- 85- **Camerer E., Rottingen J-A., Iversen J-G., Prydz H.** Coagulation factors VII and X induce Ca^{2+} oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteolytically active. *J. Biol. Chem.* 1996;271:29034-29042.
- 86- **Ollivier V., Bentolila S., Chabbat J., Hakim J., de Prost D.** Tissue factor-dependent VEGF production by human fibroblasts in response to activated factor VII. 1998, sous presse.
- 87- **Clauss M., Gerlach M., Gerlach H., Brett J., Wang F., Familletti PC., Pan YCE., Olander JV., Connolly DT., Stern D.** Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 1990;172:1535-1545.
- 88- **Pendurthi UR., Alok D., Rao LV.** Binding of factor VIIa to tissue factor induces alterations in gene expression in human fibroblast cells: up-regulation of poly(A)polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94:12598-12603.
- 89- **Ott I., Fischer EG., Miyagi Y., Mueller BM., Ruf W.** A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J. Cell. Biol.* 1998;140:1241-1253.
- 90- **Poulsen LK., Jacobsen N., Srensen BB., Berghem NCH., Kelly JD., Foster DC., Thastrup O., Ezban M., Petersen LC.** Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J. Biol. Chem.* 1998;273:6228-6232.

- 91- **Hagen F., Gray C., O'Hara P., Grant FJ., Saari GC., Woodbury RG., Hart CE., Insley M., Kisiel W., Kurachi K., et al.** Characterization of a cDNA coding for human VII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986;83:2412-2416.
- 92- **Tulinsky A.** The structures of domains of blood proteins. *Thromb. Haemost.* 1991;66:16-31.
- 93- **Radcliffe R., Nemerson Y.** Mechanism of activation of bovine factor VII. Products of cleavage by factor Xa. *J. Biol. Chem.* 1976;251:4749-4802.
- 94- **Miller BC., Hultin MB., Jesty J.** Altered factor VII activity in hemophilia. *Blood.* 1985;65:845-849.
- 95- **Morrissey JH., Macik BG., Neuenschwander PF., Comp PC.** Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood.* 1993;81:734-744.
- 96- **Seligsohn U., Kasper CK., Osterud B., Rapaport SI.** Activated factor VII: presence in factor IX concentrates and persistence in the circulation after infusion. *Blood.* 1979;53:828-837.
- 97- **Broze GJ., Majerus PW.** Purification and properties of human coagulation factor VII. *J. Biol. Chem.* 1980;255:1242-1247.
- 98- **Kondo S., Kisiel W.** Regulation of factor VIIa in plasma: evidence that antithrombin III is the sole plasma protease inhibitor of human factor VIIa. *Thromb. Res.* 1987;46:325-335.
- 99- **Radcliffe R., Nemerson Y.** Activation and control of factor VII by activated factor X and thrombin. *J. Biol. Chem.* 1975;250:388-395.
- 100- **Nemerson Y., Repke D.** Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: the role of a bifunctional coagulation cofactor. *Thromb. Res.* 1985;40:351-358.
- 101- **Rao LVM., Rapaport SI.** Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85:6687-6691.
- 102- **Nakagaki T., Foster DC., Berkner KL., Kisiel W.** Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII. *Biochemistry.* 1991;30:10819-10824.
- 103- **Yamamoto M., Nakagaki T., Kisiel W.** Tissue factor dependent autoactivation of human blood coagulation factor VII. *J. Biol. Chem.* 1992;267:19089-19094.

- 104- **Neuenschwander PF., Morrissey JH.** Deletion of the membrane anchoring region of tissue factor abolishes autoactivation of factor VII but not cofactor function. Analysis of a mutant with a selective deficiency in activity. *J. Biol. Chem.* 1992;267:14477-14482.
- 105- **Fiore MM., Neuenschwander PF., Morrissey JH.** The biochemical basis for the apparent defect of soluble mutant tissue factor in enhancing the proteolytic activities of factor VIIa. *J. Biol. Chem.* 1994;269:143-149.
- 106- **Neuenschwander PF., Fiore MM., Morrissey JH.** Factor VII autoactivation proceeds via interaction of distinct protease-cofactor and zymogen-cofactor complexes. *J. Biol. Chem.* 1993;268:21489-21492.
- 107- **Bach R., Gentry R., Nemerson Y.** Factor VII binding to tissue factor in reconstituted phospholipid vesicles: induction of cooperativity by phosphatidylserine. *Biochemistry.* 1986;25:4007-4020.
- 108- **Ruf W., Rehemtulla A., Morrissey JH., Edgington TS.** Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. *J. Biol. Chem.* 1991;266:2158-2166.
- 109- **Neuenschwander PF., Bianco-Fisher E., Rezaie AR., Morrissey JH.** Phosphatidylethanolamine augments factor VIIa-tissue factor activity: enhancement of sensitivity to phosphatidylserine. *Biochemistry.* 1995;34:13988-13993.
- 110- **McCallum CD., Hapak RC., Neuenschwander PF., Morrissey JH., Johnson AE.** The location of the active site of blood coagulation factor VIIa above the membrane surface and its reorientation upon association with tissue factor. *J. Biol. Chem.* 1996;271:28168-28175.
- 111- **Husten EJ., Esmon CT., Johnson AE.** The active site of blood coagulation factor Xa. Its distance from the phospholipid surface and its conformational sensitivity to components of the prothrombinase complex. *J. Biol. Chem.* 1987;262:12953-12961.
- 112- **Bom VJJ., Bertina RM.** The contributions of Ca²⁺, phospholipids and tissue-factor apoprotein to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor VII. *Biochem. J.* 1990;265:327-336.
- 113- **Kalafatis M., Swords NA., Rand MD., Mann KG.** Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1994;1227:113-129.

- 114- **Komiyama Y., Pedersen AH., Kisiel W.** Proteolytic activation of human factor IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochemistry*. 1990;29:9418-9425.
- 115- **Ruf W., Kalnik MW., Lund-Hansen T., Edgington TS.** Characterization of factor VII association with tissue factor in solution- High and low affinity calcium binding sites in factor VII contribute to functionally distinct interactions. *J. Biol. Chem.* 1991;266:15719-15725.
- 116- **Sakai T., Lund-Hansen T., Thim L., Kisiel W.** The γ -carboxyglutamic acid domain of human factor VIIa is essential for its interaction with cell surface tissue factor. *J. Biol. Chem.* 1990;265:1890-1894.
- 117- **McCallum CD., Su B., Neuenschwander PF., Morrissey JH., Johnson AE.** Tissue factor positions and maintains the factor VIIa active site far above the membrane surface even in the absence of the factor VIIa Gla domain. A fluorescence resonance energy transfer study. *J. Biol. Chem.* 1997;272:30160-30166.
- 118- **Toomey JR., Smith KJ., Stafford DW.** Localization of the human tissue factor recognition determinant of human factor VIIa. *J. Biol. Chem.* 1991;266:19198-19202.
- 119- **Edgington TS., Dickinson CD., Ruf W.** The structural basis of function of the TF•VIIa complex in the cellular initiation of coagulation. *Thromb. Haemost.* 1997;78:401-405.
- 120- **Lawson JH., Butenas S., Mann KG.** The evaluation of complex-dependent alterations in human factor VIIa. *J. Biol. Chem.* 1992;267:4834-4843.
- 121- **Krishnaswamy S.** The interaction of human factor VIIa with tissue factor. *J. Biol. Chem.* 1992;267:23696-23706.
- 122- **Monroe DM., Hoffman M., Oliver JA., Roberts HR.** Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor. *Br. J. Haematol.* 1997;99:542-547.
- 123- **Novotny WF., Girard TJ., Miletich JP., Broze GJ.** Purification and characterization of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor from human plasma. *J. Biol. Chem.* 1989;264:18832-18837.
- 124- **Sandset PM., Abildgaard U., Larsen ML.** Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb. Res.* 1988;50:803-813.
- 125- **Rapaport AI.** Inhibition of factor VIIa/tissue factor-induced blood coagulation: with particular emphasis upon a factor Xa-dependent inhibitory mechanism. *Blood.* 1989;73:359-365.

- 126- **Gouin-Thibault I., Dewar L., Craven S., Kulczycky M., Wun T-C., Ofosu FA.** Probable regulation of factor VIIa-tissue factor and prothrombinase by factor Xa-TFPI and TFPI in vivo. *Br. J. Haematol.* 1996;95:738-746.
- 127- **Lawson JH., Butenas S., Ribarik N., Mann KG.** Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin-III and heparin. *J. Biol. Chem.* 1993;268:767-770.
- 128- **Rao LV., Nordfang O., Hoang AD., Pendurthi UR.** Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surfaces. Comparison with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity. *Blood.* 1995;85:121-129.
- 129- **Rao LVM., Rapaport SI., Hoang AD.** Binding of factor-VIIa to tissue factor permits rapid antithrombin-III heparin inhibition of factor VIIa. *Blood.* 1993;81:2600-2607.
- 130- **Waalder BA.** Simultaneous contribution to the formation of thrombin by the intrinsic and extrinsic blood clotting systems. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1957;9:322-330.
- 131- **Osterud B., Rapaport SI.** Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977;74:5260-5264.
- 132- **Almus FE., Rao LVM., Rapaport SI.** Functional properties of factor VIIa/tissue factor formed with purified tissue factor and with tissue factor expressed on cultured endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 1989;62:1067-1073.
- 133- **Bom VJJ., van Hinsberg VWM., Reinalda-Poot HH., Mohanlal RW., Bertina RM.** Extrinsic activation of human coagulation factor IX and X on the endothelial surface. *Thromb. Haemost.* 1991;66:283-291.
- 134- **Lawson JH., Mann KG.** Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation. *J. Biol. Chem.* 1991;266:11317-11327.
- 135- **McGee MP., Foster S., Wang X.** Simultaneous expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes. A potential mechanism for localized control of blood coagulation. *J. Exp. Med.* 1994;179:1847-1854.
- 136- **Couturier C., Haeffner-Cavaillon N., Caroff M., Kaztchkine M.** Binding sites for endotoxins (lipopolysaccharides) on human monocytes. *J. Immunol.* 1991;147:1899-1904.
- 137- **Fan PT., Edgington TS.** Coupling of the adhesive receptor CD11b/CD18 to functional enhancement of effector macrophage tissue factor response. *J. Clin. Invest.* 1991;87:50-57.

- 138- **Heumann D., Gallay P., Barras C., Zaech P., Ulevitch R., Tobias PS., Glauser MP., Baumgartner JD.** Control of lipopolysaccharide (LPS) binding and LPS-induced tumor necrosis factor secretion in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 1992;148:3505-3512.
- 139- **Wright SD., Ramos RA., Tobias PS., Ulevitch RJ., Mathison JC.** CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990;249:1431-1432.
- 140- **Schumann RR.** Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res. Immunol.* 1992;143:11-15.
- 141- **Verghese MW., Snyderman R.** Signal transduction and intracellular messengers. *In Human Monocytes, M. Zembala and GL. Asherson, ed: Academic Press, Great Britain,* 1989:101-112.
- 142- **Pettersen KS., Wiiger MT., Narahara N., Andoh K., Gaudernack G., Prydz H.** Induction of tissue factor synthesis in human umbilical vein endothelial cells involves protein kinase C. *Thromb. Haemost.* 1992;67:473-477.
- 143- **Ternisien C., Ramani M., Ollivier V., Khechai F., Vu T., Hakim J., De Prost D.** Endotoxin-induced tissue factor in human monocytes is dependent upon protein kinase C activation. *Thromb. Haemost.* 1993;70:800-806.
- 144- **Jackson SP.** Regulating transcription factor activity by phosphorylation. *Trends. Cell Biol.* 1992;2:104-108.
- 145- **Ternisien C., Ollivier V., Khechai F., Ramani M., Hakim J., De Prost D.** Protein tyrosine kinase activation is required for LPS and PMA induction of tissue factor mRNA in human blood monocytes. *Thromb. Haemost.* 1995;73:413-420.
- 146- **Osterud B., Olsen JO., Wilsgard L.** The role of arachidonic acid release and lipooxygenase pathway in lipopolysaccharide-induced thromboplastin activity in monocytes. *Blood. Coagul. Fibrinolysis.* 1990;1:41-46.
- 147- **Ollivier V., Houssaye S., Ternisien C., Leon A., De Verneuil H., Elbim C., Mackman N., Edgington TS., De Prost D.** Endotoxin-induced tissue factor mRNA in human monocytes is negatively regulated by a cyclic AMP-dependent mechanism. *Blood.* 1993;81:973-979.

- 148- **Consonni R., Bertina RM.** Antigenic and functional expression of tissue factor in endotoxin stimulated U937 cells: regulation of activity by calcium ionophore A23187. *Thromb. Haemost.* 1995;74:904-909.
- 149- **Crutchley DJ., Conanan LB., Que BG.** K⁺ channel blockers inhibit tissue factor expression by human monocytic cells. *Circ. Res.* 1995;76:16-20.
- 150- **Brand K., Fowler BJ., Edgington TS., Mackman N.** Tissue factor mRNA in THP-1 monocytic cells is regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels in response to lipopolysaccharide. *Mol. Cell. Biol.* 1991;11:4732-4738.
- 151- **Kadonaga JT., Jones KA., Tjian R.** Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription. *Trends. Biol. Sci.* 1986;11:20-23.
- 152- **Oeth P., Parry GCN., Mackman N.** Regulation of tissue factor gene in human monocytic cells. Role of AP-1, NF- κ B/Rel, and Sp1 proteins in uninduced and lipopolysaccharide-induced expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17:365-374.
- 153- **Mackman N., Brand K., Edgington TS.** Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor κ B binding sites. *J. Exp. Med.* 1991;174:1517-1526.
- 154- **Müller JM., Ziegler-Heitbrock HWL., Baeuerle PA.** Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiol.* 1993;187:233-256.
- 155- **Oeth PA., Parry GCN., Kunsch C., Nantermet P., Rosen CA., Mackman N.** Lipopolysaccharide induction of tissue factor gene expression in monocytic cells is mediated by binding of c-Rel/p65 heterodimers to a κ B-like site. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14:3772-3781.
- 156- **Hartzell S., Ryder K., Lanahan A., Lau LF., Nathans D.** A growth factor-responsive gene of murine BALB/c 3T3 cells encodes a protein homologous to human tissue factor. *Mol. Cell. Biol.* 1989;9:2567-2573.
- 157- **Van der Logt CPE., Reitsma PH., Bertina RM.** Alternative splicing is responsible for the presence of two tissue factor mRNA species in LPS stimulated human monocytes. *Thromb. Haemost.* 1992;67:272-276.
- 158- **Altieri DC., Morrissey JH., Edgington TS.** Adhesive receptor Mac-1 coordinates the activation of factor X on stimulated cells of monocytic and myeloid differentiation: an

- alternative initiation of the coagulation protease cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85:7462-7466.
- 159- **Mesri M., Plescia J., Altieri DC.** Dual regulation of ligand binding by CD11b I domain. Inhibition of intercellular adhesion and monocyte procoagulant activity by a factor X-derived peptide. *J. Biol. Chem.* 1998;273:744-748.
- 160- **Plescia J., Altieri DC.** Activation of Mac-1 (CD11b/CD18)-bound factor X by released cathepsin G defines an alternative pathway of leukocyte initiation of coagulation. *Biochem. J.* 1996;319:873-879.
- 161- **Rozdzinski E., Sandros J., van der Flier M., Young A., Spellerberg B., Bhattacharyya C., Straub J., Musso G., Putney S., Starzyk R.** Inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions and inflammation by peptides from a bacterial adhesin which mimic coagulation factor X. *J. Clin. Invest.* 1995;95:1078-1085.
- 162- **Turkington PT.** Cathepsin G activates human factor V in vitro. *Thromb. Res.* 1993;72:333-337.
- 163- **Allen DH., Tracy PB.** Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. *J. Biol. Chem.* 1995;270:1408-1415.
- 164- **Altieri DC., Edgington TS.** Identification of effector cell protease receptor-1: a leukocyte-distributed receptor for the serine protease factor Xa. *J. Immunol.* 1990;145:246-253.
- 165- **Nicholson AC., Nachman RL., Altieri DC., Summers BD., Ruf W., Edgington TS., Hajjar DP.** Effector cell protease receptor-1 is a vascular receptor for coagulation factor Xa. *J. Biol. Chem.* 1996;271:28407-28413.
- 166- **Bono F., Heralut J-P., Avril C., Schaeffer P., Lormeau J-C., Herbert J-M.** Human umbilical vein endothelial cells express high affinity receptors for factor Xa. *J. Cell. Physiol.* 1997;172:36-43.
- 167- **Steinberg SD., Stern D., Nawroth P., Bielizikian J.** Factor Xa elevates cytosolic calcium in cultured endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 1985;54:994.
- 168- **Gasic GP., Arenas CP., Gasic TB., Gasic GJ.** Coagulation factors X, Xa, and protein S as potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:2317-2320.

- 169- **Herbert J-M., Bono F., Herault J-P., Avril C., Dol F., Mares A-M., Schaeffer P.** Effector protease receptor-1 mediates the mitogenic activity of factor Xa for vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 1998;101:993-1000.
- 170- **Ambrosini G., Plescia J., Chu KC., High KA., Altieri DC.** Activation-dependent exposure of the inter-EGF sequence Leu83-Leu88 in factor Xa mediates ligand binding to effector cell protease receptor-1. *J. Biol. Chem.* 1997;272:8340-8345.
- 171- **Bouchard BA., Catcher CS., Thrash BR., Adida C., Tracy PB.** Effector cell protease receptor-1, a platelet activation-dependent membrane protein, regulates prothrombinase-catalyzed thrombin generation. *J. Biol. Chem.* 1997;272:9244-9251.
- 172- **Hérault J-P, Bono F., Avril P., Schaeffer P., Herbert J-M.** soumis à publication.
- 173- **Satta N., Toti F., Feugeas O., Bohbot A., Dachary-Prigent J., Eschwège V., Hedman H., Freyssinet JM.** Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 1994;153:3245-3251.
- 174- **Robinson RA., Worfolk L., Tracy PB.** Endotoxin enhances the expression of monocyte prothrombinase activity. *Blood.* 1992;79:406-416.
- 175- **Rapaport SI., Rao LVM.** Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler. Thromb.* 1992;12:1111-1121.
- 176- **Meade TW., Mellows S., Brozovic M., Miller GJ., Chakrabarti RR., North WR., Haines AP., Stirling Y., Imeson JD., Thompson SG.** Haemostatic function and ischemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet.* 1986;2:533-537.
- 177- **Stary HC., Chandler AB., Dinsmore RE., Fuster V., Glagov S., Insull W., Jr., Rosenfeld ME., Schwartz CJ., Wagner WD., Wissler RW.** A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92:1355-1374.
- 178- **Van der Wal AC., Becker AE., van der Loos CM., Das PK.** Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 1994;89:36-44.
- 179- **Zeldis S., Nemerson Y., Pitlick R., Lentz T.** Tissue factor (thromboplastin): localization by peroxidase conjugated antibodies. *Science.* 1972;175:766-768.

- 180- **Annex BH., Denning SM., Channon KM., Sketch MH., Stack RS., Morrissey JH., Peters KG.** Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. *Circulation*. 1995;91:619-622.
- 181- **Marmur JD., Thiruvikraman SV., Fyfe BS., Guha A., Sharma SK., Ambrose JA., Fallon JT., Nemerson Y., Taubman MB.** Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. *Circulation*. 1996;94:1226-1232.
- 182- **Thiruvikraman SV., Guha A., Roboz J., Taubman MB., Nemerson Y., Fallon JT.** In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X. *Lab. Invest*. 1996;75:451-461.
- 183- **Toschi V., Gallo R., Lettino M., Fallon JT., Gertz SD., Fernandez-Ortiz A., Chesebro JH., Badimon L., Nemerson Y., Fuster V., Badimon JJ.** Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1997;95:594-599.
- 184- **Tipping PG., Malliaros J., Holdsworth SR.** Procoagulant activity expression by macrophages from atheromatous vascular plaques. *Atherosclerosis*. 1989;79:237-243.
- 185- **Moreno PR., Bernardi VH., Lopez-Cuellar J., Murcia AM., Palacios IF., Gold HK., Mehran R., Sharma SK., Nemerson Y., Fuster V., Fallon JT.** Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. *Circulation*. 1996;94:3090-3097.
- 186- **Kaikita K., Ogawa H., Yasue H., Takeya M., Takahashi K., Saito T., Hayasaki K., Horiuchi K., Takizawa A., Kamikubo Y., Nakamura S.** Tissue factor expression on macrophages in coronary plaques in patients with unstable angina. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1997;17:2232-2237.
- 187- **Ardissino D., Merlini PA., Ariens R., Coppola R., Bramucci E., Mannucci PM.** Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet*. 1997;349:769-771.
- 188- **Mazzone A., De Servi S., Ricevuti G., Mazzucchelli I., Fossati G., Passoti D., Bramucci E., Angoli I., Marsico F., Specchia G., Notario A.** Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation*. 1993;88:358-363.
- 189- **Leatham EW., Bath PMW., Tooze JA., Camm AJ.** Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease. *Br. Heart. J*. 1995;73:10-13.

- 190- **Neri Serneri G., Modesti PA., Gensini GF., Branzi A., Melandri G., Poggesi L., Rostagno C., Tamburini C., Carnovali M., Magnani B.** Randomised comparison of subcutaneous heparin, intravenous heparin, and aspirin in unstable angina. *Lancet*. 1995;345:1201-1204.
- 191- **Jude B., Agraou B., McFadden EP., Susen S., Bauters C., Lepelley P., Vanhaesbroucke C., Devos P., Cosson A., Asseman P.** Evidence for time-dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or stable angina. *Circulation*. 1994;90:1662-1668.
- 192- **Clowes AW., Reidy MA., Clowes MM.** Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. *Lab. Invest*. 1983;49:327-333.
- 193- **Richardson M., Kinlough-Rathbone RL., Groves HM., Jorgensen J., Mustard JF., Moore S.** Ultrastructural changes in re-endothelialized and non-endothelialized rabbit aortic neo-intima following re-injury with a balloon catheter. *Br. J. Exp. Path*. 1984;64:597-611.
- 194- **Groves HM., Kinlough-Rathbone R., Richardson M., Jorgensen L., Moore S., Mustard JF.** Thrombin generation and fibrin formation following injury to rabbit neointima. *Lab. Invest*. 1982;6:605-612.
- 195- **Diquelou A., Dupouy D., Gaspin D., Constans J., Sié P., Boneu B., Sakariassen KS., Cadroy Y.** Relationship between endothelial tissue factor and thrombogenesis under flow conditions. *Thromb. Haemost*. 1995;74:778-783.
- 196- **Speidel CM., Eisenberg PR., Ruf W., Edgington TS., Abendschein DR.** Tissue factor mediates prolonged procoagulant activity on the luminal surface of balloon-injured aortas in rabbits. *Circulation*. 1995;92:3323-3330.
- 197- **Pawashe AB., Golino P., Ambrosio G., Migliaccio F., Ragni M., Pascucci I., Chiariello M., Bach R., Garen A., Konigsberg WK., Ezekowitz MD.** A monoclonal antibody against rabbit tissue factor thrombus formation in stenotic injured rabbit carotid arteries. *Circ. Res*. 1994;74:56-63.
- 198- **Gallo R., Fallon JT., Toschi V., Gertz SD., Padurean A., Nemerson Y., Chesebro JH., Fuster V., Badimon JJ.** Bi-phasic increase of tissue factor activity after angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation*. 1995;92:I-354.
- 199- **Hamon M., Bauters C., McFadden EP., Wernert N., Lablanche J-M., Dupuis B., Bertrand ME.** Restenosis after coronary angioplasty. *Eur. Heart. J*. 1995;16:33-48.

- 200- **Fager G.** Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1995;77:645-650.
- 201- **Jang Y., Guzman LA., Lincoff M., Gottsauner-Wolf M., Forudi F., Hart CE., Courtman DW., Ezban M., Ellis SG., Topol EJ.** Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation.* 1995;92:3041-3050.
- 202- **Isner JM., Kearney M., Bortman S., Passeri J.** Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation.* 1995;91:2703-2711.
- 203- **Han DKM., Haudenschild CC., Hong MK., Tinkle BT., Leon MB., Liao G.** Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am. J. Pathol.* 1995;147:267-277.
- 204- **Koopman G., Reutelingsperger C., Kuijten G., Keehnen R., Pals S., van Oehrs M.** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994;84:1415-1420.
- 205- **Mower D., Peckham D., Illera V., Fishbaugh J., Stunz L., Ashman R.** Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis. *J. Immunol.* 1994;152:4832-4842.
- 206- **Henrikson K.** Thrombin as a hormonally regulated growth factor in estrogen-responsive tissue. *Semin. Thromb. Haemost.* 1992;18:53-59.
- 207- **Soifer S., Peters K., O'Keefe J., Coughlin S.** Disparate temporal expression of prothrombin and thrombin receptor genes during mouse development. *Am. J. Pathol.* 1994;144:60-69.
- 208- **Maynard J., Heckman C., Pitlick F., Nemerson Y.** Association of tissue factor activity with the surface of cultured cells. *J. Clin. Invest.* 1975;55:814-824.
- 209- **Fadok V., Voelker D., Campbell P., Cohen J., Bratton D., Henson P.** Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 1992;148:2207-2216.
- 210- **Greeno EW., Bach RR., Moldow CF.** Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. *Lab. Invest.* 1996;75:281-289.
- 211- **Aupeix K., Toti F., Satta N., Bischoff P., Freyssinet J-M.** Oxysterols induce membrane procoagulant activity in monocytic THP-1 cells. *Biochem. J.* 1996;314:1027-1033.

- 212- **Flynn PD., Byrne CD., Baglin TP., Weissberg PL., Bennet MR.** Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood*. 1997;89:4378-4384.
- 213- **Aupeix K., Hugel B., Martin T., Bischoff P., Lill H., Pasquali J-L., Freyssinet J-M.** The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J. Clin. Invest.* 1997;99:1546-1554.
- 214- **Mallat Z., Hugel B., Ohan J., Lesèche G., Freyssinet J-M.** Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques. *Arch. Mal. Cœur*. 1998 sous presse.
- 215- **Fabricant CG., Fabricant J., Litrenta MM., Minick CR.** Virus-induced atherosclerosis. *J. Exp. Med.* 1978;148:335-340.
- 216- **Hendricks MGR., Salimens MMM., Vanboven CPA., Bruggeman CA.** High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 1990;136:23-28.
- 217- **Chiu B., Viira E., Tucker W., Fong IW.** *Chlamydia pneumoniae*, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*. 1997;96:2144-2148.
- 218- **Kovacs AK., Weber ML., Burns LJ., Jacob HS., Vercellotti GM.** Cytoplasmic sequestration of p53 in cytomegalovirus-infected endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 1996;149:1531-1539.
- 219- **Speir E., Modali R., Huang ES., Leon MB., Shawl F., Finkel T., Epstein SE.** Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*. 1994;265:391-394.
- 220- **Taylor-Wiedeman J., Sissons JP., Borysiewicz LK., Sinclair JH.** Monocytes are a major site of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 1991;72:2059-2064.
- 221- **Guetta E., Guetta V., Shibutani T., Epstein SE.** Monocytes harboring cytomegalovirus: interactions with endothelial cells, smooth muscle cells, and oxidized low-density lipoprotein. Possible mechanisms for activating virus delivered by monocytes to sites of vascular injury. *Circ. Res.* 1997;81:8-16.
- 222- **Van Dam-Mieras MCE., Muller AD., van Hinsbergh VWM., Mullers WJHA., Bomans PHH., Bruggeman CA.** The procoagulant response of cytomegalovirus infected endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 1992;68:364-370.

- 223- **Kowalik TF., Wing B., Haskill JS., Azizkhan JC., Baldwin AS., Huang ES.** Multiple mechanisms are implicated in the regulation of NF κ B activity during human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;90:1107-1111.
- 224- **Campbell LA., O'Brien ER., Cappuccio AL., Kuo CC., Wang SP., Stewart D., Patton DL., Cummings PK., Grayston JT.** Detection of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in human atherectomy tissues. *J. Infect. Dis.* 1995;172:585-588.
- 225- **Maseri A.** Inflammation, atherosclerosis, and ischemic events percutaneous transluminal angioplasty. *N. Engl. J. Med.* 1997;336:1014-1016.
- 226- **Thiagaradjan P., Niemetz J.** Procoagulant tissue factor activity of circulating peripheral blood leucocytes. Results of in vivo studies. *Thromb. Res.* 1980;17:891-896.
- 227- **Semeraro N., Colucci M.** Changes in the coagulation-fibrinolysis balance of endothelial cells and mononuclear phagocytes: role in disseminated intravascular coagulation associated with infectious diseases. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1992;21:214-220.
- 228- **Semeraro N., Colucci M., Mussoni L., Donati MB.** Rat blood leukocytes, unlike rabbit leukocytes, do not generate procoagulant activity on exposure to endotoxin. *Br. J. Exp. Path.* 1981;62:638-642.
- 229- **Wilcox JN., Hasko JA., Deisher TA., Bunting S.** Identification of cells expressing tissue factor mRNA by in situ hybridization after an in vivo administration of endotoxin to rats. *Thromb. Haemost.* 1989;62:1084a.
- 230- **Ryan J., Brett J., Tijburg P., Bach RR., Kisiel W., Stern D.** Tumor necrosis factor-induced endothelial tissue factor is associated with subendothelial matrix vesicles but is not expressed on the apical surfaces. *Blood.* 1992;80:966-974.
- 231- **Rothberger H., Dove FB., Lee TK., McGee MP., Kardon B.** Procoagulant activity of lymphocyte-macrophage populations in rabbits: selective increases in marrow, blood and spleen cells during Schwartzman reactions. *Blood.* 1983;61:712-717.
- 232- **Montemurro P., Lattanzio A., Chetta G., Lupo L., Caputi-Iambrenghi L., Rubino M., Giordano D., Semeraro N.** Increased in vitro and in vivo generation of procoagulant activity (tissue factor) by mononuclear phagocytes after intralipid infusion in rabbits. *Blood.* 1985;65:1391-1395.
- 233- **Semeraro N., Triggiani R., Montemurro P., Cavallo LG., Colucci M.** Enhanced endothelial tissue factor but normal thrombomodulin in endotoxin-treated rabbits. *Thromb. Res.* 1993;71:479-486.

- 234- **Mackman N., Sawdey MS., Keaton MR., Loskutoff DJ.** Murine tissue factor gene expression in vivo. Tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide. *Am. J. Pathol.* 1993;143:76-84.
- 235- **Drake TA., Gheng J., Chang A., Taylor FB.** Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am. J. Pathol.* 1993;142:1458-1470.
- 236- **Warr TA., Mohan Rao LV., Rapaport SI.** Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor : effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity. *Blood.* 1990;75:1481-1489.
- 237- **Taylor FB., Chang A., Ruf W., Morrissey JH., Hinshaw L., Catlett R., Blick K., Edgington TS.** Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ. Shock.* 1991;33:127-134.
- 238- **Levi M., ten Cate H., van der Poll T., van Deventer SJH.** Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA.* 1994;270:975-979.
- 239- **Day KC., Hoffman LC., Palmier MO., Kretzmer KK., Huang MD., Pyla EY., Spokas E., Broze GJ., Jr., Warren TG., Wün T-C.** Recombinant lipoprotein-associated coagulation inhibitor inhibits thromboplastin induced intravascular coagulation in the rabbit. *Blood.* 1990;76:1538-1545.
- 240- **Sandset PM., Warn-Cramer BJ., Mohan Rao LV., Maki SL., Rapaport SI.** Depletion of extrinsic pathway inhibitor (EPI) sensitizes rabbits to disseminated intravascular coagulation induced with tissue factor: evidence supporting a physiological role for EPI as a natural anticoagulant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88:708-712.
- 241- **Creasey AA., Chang ACK., Feigen L., Wün T-C., Taylor FB., Jr., Hinshaw LB.** Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia coli* septic shock. *J. Clin. Invest.* 1993;91:2850-2860.
- 242- **Taylor FB., Chang A., Esmon CT., D'Angelo A., Vigano-D'Angelo S., Blick KE.** Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboons. *J. Clin. Invest.* 1987;79:918-925.
- 243- **Taylor FB., Emerson TE., Jordan R., Chang AK., Blick KE.** Antithrombin-III prevents the lethal effects of *Escherichia coli* infusion in baboons. *Circ. Shock.* 1988;26:227-235.

- 244- **Taylor FB., Chang AK., Peer GT., Mather T., Blick KE., Catlett R., Lockhart M., Esmon CT.** DEGR-factor Xa blocks disseminated intravascular coagulation initiated by *Escherichia coli* without preventing shock or organ damage. *Blood*. 1991;78:364-368.
- 245- **Osterud B., Flaegstad T.** Increased tissue thromboplastin in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis. *Thromb. Haemost.* 1983;49:5-7.
- 246- **Almdahl SM., Brox JH., Osterud B.** Mononuclear phagocyte thromboplastin and endotoxin in patients with secondary peritonitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 1987;22:914-918.
- 247- **Michie HR., Manogue KR., Spriggs DR., Revhaus A., O'Dwyer S., Dinarello CA., Cerami A., Wolff SM., Wilmore DW.** Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N. Engl. J. Med.* 1988;318:1481-1486.
- 248- **van Deventer SJH., Buller HR., ten Cate JW., Aarden LA., Hack CE., Sturk A.** Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood*. 1990;76:2520-2526.
- 249- **Ziegler EJ., Fisher CJ., Jr., Sprung CL., Straube RC., Sadoff JC., Foulke GE., Wortel CH., Fink MP., Dellinger RP., Teng NN., Allen IE., Berger HJ., Knatterud GL., LoBuglio AF., Smith CR.** Treatment of gram negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N. Engl. J. Med.* 1992;324:429-436.
- 250- **Wenzel RP.** Anti-endotoxin antibodies – a second look. *N. Engl. J. Med.* 1992;326:1151-1153.
- 251- **Muhlfelder TW., Niemetz J., Kang S.** Glucocorticoids inhibit the generation of leukocyte procoagulant (tissue factor) activity. *Blood*. 1982;60:1169-1172.
- 252- **Bottles KD., Morrissey JH.** Dexamethasone enhances agonist induction of tissue factor in monocytes but not in endothelial cells. *Blood. Coagul. Fibrinolysis.* 1993;4:405-414.
- 253- **Carlsen E., Gaudernack G., Filion-Myklebust C., Pettersen KS., Prydz H.** Allogeneic induction of thromboplastin synthesis in monocytes and endothelial cells. Biphasic effect of cyclosporin A. *Clin. Exp. Immunol.* 1989;76:428-433.
- 254- **Helin HJ., Edgington TS.** Cyclosporin A regulates monocyte/macrophage effector functions by affecting instructor T cells: inhibition of monocyte procoagulant response to allogeneic stimulation. *J. Immunol.* 1984;132:1074-1076.

- 255- **Hölschermann H., Dürfeld F., Maus U., Bierhaus A., Heidinger K., Lohmeyer J., Nawroth PP., Tillmanns H., Haberbosch W.** Cyclosporine A inhibits tissue factor expression in monocytes/macrophages. *Blood*. 1996;10:3837-3845.
- 256- **Conese M., Montemurro P., Fumarulo R., Giordano D., Riccardi S., Colucci M., Semeraro N.** Inhibitory effect of retinoids on the generation of procoagulant activity by blood mononuclear phagocytes. *Thromb. Haemost.* 1991;66:662-665.
- 257- **Barstad RM., Hamers MJAG., Stephens RW., Sakariassen KS.** Retinoic acid reduces induction of monocyte tissue factor and tissue factor/factor VIIa-dependent arterial thrombus formation. *Blood*. 1995;86:212-218.
- 258- **De Prost D., Ollivier V., Hakim J.** Pentoxifylline inhibition of procoagulant activity generated by activated mononuclear phagocytes. *Mol. Pharmacol.* 1990;38:562-566.
- 259- **Brozna JP., Carson DC.** Monocyte-associated tissue factor is suppressed by Phorbol Myristate Acetate. *Blood*. 1988;72:456-462.
- 260- **Oeth P., Mackman N.** Salicylates inhibit lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of the tissue factor gene in human monocytic cells. *Blood*. 1995;86:4144-4152.
- 261- **Osnes LTN., Foss KB., Joo GB., Okkenhaug C., Westvik AB., Ovstebo R., Kierulf P.** Acetylsalicylic acid and sodium salicylate inhibit LPS-induced NF- κ B/c-Rel nuclear translocation, and synthesis of tissue factor (TF) and tumor necrosis factor alfa (TNF- α) in human monocytes. *Thromb. Haemost.* 1996;76:970-976.
- 262- **Crutchley D., Hirsh M.** The stable prostacyclin analog, Iloprost and prostaglandin E1 inhibit monocyte procoagulant activity in vitro. *Blood*. 1991;78:382-386.
- 263- **Galvez A., Gomez-Ortiz G., Diaz-Ricart M., Escolar G., Gonzalez-Sarmiento R., Zurbano MJ., Ordinas A., Castillo R.** Desmopressin (DDAVP) enhances platelet adhesion to the extracellular matrix of cultured human endothelial cells through increased expression of tissue factor. *Thromb. Haemost.* 1997;77:975-980.
- 264- **Colli S., Eligini S., Lalli M., Camera M., Paoletti R., Tremoli E.** Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17:265-272.
- 265- **Bierhaus A., Zhang Y., Quehenberger P., Luther T., Haase M., Müller M., Mackman N., Ziegler R., Nawroth PP.** The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF- κ B. *Thromb. Haemost.* 1997;77:772-782.

- 266- **Brisseau GF., Dackiw APB., Cheung PYC., Christie N., Rotstein OD.** Posttranscriptional regulation of macrophage tissue factor expression by antioxidants. *Blood*. 1995;85:1025-1035.
- 267- **Falanga A., Bolognese d'Alesandro AP., Casali B., Roncaglioni MC., Donati MB.** Several murine metastazing tumors possess a cysteine proteinase with cancer procoagulant characteristics. *Int. J. Cancer*. 1987;39:774-777.
- 268- **Edwards RL., Silver J., Rickles FR.** Human tumor procoagulants: registry of the subcommittee on haemostasis and malignancy of the scientific and standardization committee, international society on thrombosis and haemostasis. *Thromb. Haemost.* 1993;69:205-213.
- 269- **Callander NS., Varki N., Rao LVM.** Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer*. 1992;70:1194-1201.
- 270- **Rambaldi A., Alessio G., Casali B., Passerini CG., Donati MB. Mantovani A., Semeraro N.** Induction of monocyte-macrophage procoagulant activity by transformed cell lines. *J. Immunol.* 1986;136:3848-3855.
- 271- **Kakkar AK., DeRuvo N., Chinswangwatanakul V., Tebbutt S., Williamson RCN.** Extrinsic-pathway activation in cancer with high factor VIIa and tissue factor. *Lancet*. 1995;346:1004-1005.
- 272- **De Prost D., Ollivier V., Ternisien C., Chollet-Martin S.** Increased monocyte procoagulant activity independent of the lupus anticoagulant in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb. Haemost.* 1990;64:216-221.
- 273- **Schved JF., Gris JC., Ollivier V., Wautier J-L., Tobelem G., Caen J.** Procoagulant activity of endotoxin or tumor necrosis factor activated monocytes is enhanced by IgG from patients with lupus anticoagulant. *Am. J. Hematol.* 1992;41:92-96.
- 274- **Courillon-Mallet A., Bevilacqua M., Wautier J-L., Dervichian M., Cattan D., Caen J.** Increased procoagulant response of monocytes from patients with familial mediterranean fever. *Thromb. Haemost.* 1986;53:211-213.
- 275- **Edwards RL., Levine JB., Green R., Duffy M., Matthews E., Brande W., Rickles FR.** Activation of blood coagulation in Crohn's disease. Increased plasma fibrinopeptide. A levels and enhancement generation of tissue factor activity. *Gastroenterology*. 1987;62:329-333.

- 276- **Blakowski SA., Zacharski LR., Beck JR.** Postoperative elevation of human peripheral blood monocyte tissue factor coagulant activity. *J. Lab. Clin. Med.* 1986;108:117-120.
- 277- **Ollivier V., Sheibani A., Chollet-Martin S., Vie P., Benacerraf R., Duparc J., De Prost D.** Monocyte procoagulant activity and membrane-associated Ddimer after knee replacement surgery. *Thromb. Res.* 1989;55:179-185.
- 278- **Osterud B., Due J.** Blood coagulation in patients with benign and malignant tumors before and after surgery. *Scand. J. Haematol.* 1984;32:258-264.
- 279- **Schwartz BS., Levy GA., Curtiss LA., Fair DS., Edgington TS.** Plasma lipoprotein induction and suppression of the generation of cellular procoagulant activity in vitro. Two procoagulant activities are produced by peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Invest.* 1981;67:1650-1658.
- 280- **Drake TA., Hannani K., Fei H., Lavis S., Berliner JA.** Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 1991;138:601-607.
- 281- **Muller AD., Houwelingen ACV., Van dam Mieras MCE., Bas BM., Hornstra G.** Effect of a moderate fish intake on haemostatic parameters in healthy males. *Thromb. Haemost.* 1989;61:468-473.
- 282- **Jude B., Watel A., Fontaine O., Fontaine P., Cosson A.** Distinctive features of procoagulant response of monocytes from diabetic patients. *Haemostasis.* 1989;19:65-73.
- 283- **Kario K., Matsuo T., Kobayashi H., Matsuo M., Sakata T., Miyata T.** Activation of tissue factor-induced coagulation and endothelial cell dysfunction in non-insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995;15:1114-1120.
- 284- **Reverter JL., Reverter JC., Tassies D., Rius F., Monteagudo J., Rubies-Prat J., Escolar G., Ordinas A., Sanmarti A.** Thrombomodulin and induced tissue factor expression on monocytes as markers of diabetic microangiopathy: a prospective study on hemostasis and lipoproteins in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Hematol.* 1997;56:93-99.
285. **Rees DD., Palmer RMJ., Moncada S.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989;86:3375-3378.

286. **Cooke JP., Singer AH., Tsao P., Zera P., Rowan RA., Billingham ME.** Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J. Clin. Invest.* 1992;90:1168-1172.
287. **Radomski MW., Palmer RMJ., Moncada S.** An L-arginine/ nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990;87:5193-5197.
288. **Garg UC., Hassid A.** Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 1989;83:1774-1777.
289. **De Caterina R., Libby P., Peng HB., Thannickal VJ., Rajavashisth TB., Gimbrone MA., Jr., Shin WS., Liao JK.** Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J. Clin. Invest.* 1995;96:60-68.
290. **Adams MR., Jessup W., Hailstones D., Celermajer DS.** L-arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules. *Circulation.* 1997;95:662-668.
291. **Zeiger AM., Fisslthaler B., Schray-Utz B., Busse R.** Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ. Res.* 1995;76:980-986.
292. **Lefler AM., Ma X-L.** Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to coronary artery endothelium. *Atheroscler. Thromb.* 1993;13:771-776.
293. **Wang BY., Singer AH., Tsao PS., Drexler H., Kosek J., Cooke JP.** Dietary arginine prevents atherogenesis in the coronary artery of the hypercholesterolemic rabbit. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1994;23:452-458.
294. **Girerd XJ., Hirsch AP., Cooke JP., Dzau VJ., Creager MA.** L-arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. *Circ. Res.* 1990;67:1301-1308.
295. **Hamon M., Vallet B., Bauters C., Wernert N., McFadden EP., Lablanche J., Dupuis B., Bertrand ME.** Long-term oral administration of L-arginine reduces intimal thickening and enhances neoendothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation after arterial injury. *Circulation.* 1994;90:1357-1362.

296. **Schwarzacher SP., Lim TT., Wang B., Kernoff RS., Niebauer J., Cooke JP., Yeung AC.** Local intramural delivery of L-arginine enhances nitric oxide generation and inhibits lesion formation after balloon angioplasty. *Circulation*. 1997;95:1863-1869.
297. **Tsao PS., McEvoy LM., Drexler H., Butcher EG., Cooke JP.** Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation*. 1994;89:2176-2182.
298. **Asahara T., Bauters C., Zheng LP., Takeshita S., Bunting S., Ferrara N., Symes JF., Isner JM.** Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1995;92:II365-II371.
299. **Gospodarowicz D., Neufeld G., Schweigerer L.** Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J. Cell. Physiol*. 1987;5:15-26.
300. **Klagsbrun M., Edelman ER.** Biological and biochemical properties of fibroblast growth factors: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1989;9:269-278.
301. **Meurice T., Bauters C., Auffray JL., Vallet B., Hamon M., Valero F., Van Belle E., Lablanche JM., Bertrand ME.** Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. *Circulation*. 1996;93:18-22.
302. **Meurice T., Bauters C., Vallet B., Corseaux D., Van Belle E., Hamon M., Dupuis B., Lablanche JM., Bertrand ME.** bFGF restores endothelium-dependent responses of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Am. J. Physiol*. 1997;272:H613-H617.
303. **Edgington TS., Mackman N., Brand K., Ruf W.** The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb. Haemost.* 1991;66:67-69.
304. **Ranganathan G., Blatti SP., Subramaniam M., Fass DN., Maihle NJ., Getz MJ.** Cloning of murine tissue factor and regulation of gene expression by transforming growth factor type β 1. *J. Biol. Chem*. 1991;266:496-501.
305. **Carson SD.** Manifestation of cryptic fibroblast tissue factor occurs at detergent concentrations which dissolve the plasma membrane. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 1996;7:303-313.
306. **Carson SD.** Continuous chromogenic tissue factor assay: comparison to clot-based assays and sensitivity established using pure tissue factor. *Thromb. Res*. 1987;47:379-387.
307. **Surprenant YM., Zuckerman SH.** A novel microtiter plate assay for the quantitation of procoagulant activity on adherent monocytes, macrophage and endothelial cells. *Thromb. Res*. 1989;53:339-346.

308. **More RS., Rutty G., Underwood MJ., Brack MJ., Gershlick AH.** A time sequence of vessel wall changes in an experimental model of angioplasty. *J. Pathol.* 1994;172:287-292.
309. **Rubbia L., Gabbiani G.** Phénotype des cellules musculaires lisses artérielles et athérosclérose. *Med. Sciences.* 1989;53:389-395.
310. **Clowes AW., Clowes MM., Fingerle J., Reidy MA.** Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1989;14:S12-S15.
311. **Clowes AW., Clowes MM., Reidy MA.** Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. III. Endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessels. *Lab. Invest.* 1986;54:295-303.
312. **Clowes AW., Clowes MM., Kocher O., Ropraz P., Chaponnier C., Gabbiani G.** Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin. *J. Cell. Biol.* 1988;107:1939-1945.
313. **Indolfi C., Esposito G., Di Lorenzo E., Rapacciuolo A., Feliciello A., Porcellini A., Avvedimento VE., Condorelli M., Chiariello M.** Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty. *Circulation.* 1995;92:1230-1235.
314. **Schwartz SM., Campbell GR., Campbell JH.** Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ. Res.* 1986;58:427-444.
315. **Lindner V.** Regrowth of arterial endothelium. Denudation with minimal trauma leads to complete endothelial cell regrowth. *Lab. Invest.* 1989;61:556-563.
316. **Reidy MA., Clowes AW., Schwartz SM.** Endothelial regeneration: V. inhibition of endothelial regrowth in arteries of rat and rabbit. *Lab. Invest.* 1983;49:569-575.
317. **Reidy MA., Standaert D., Schwartz SM.** Inhibition of endothelial cell regrowth. Cessation of aortic endothelial cell replication after balloon catheter denudation. *Arteriosclerosis.* 1982;2:216-220.
318. **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-809.
319. **Kim WM., Merskey C., Deming QB., Adel HN., Wolinsky H., Clarkson TB., Lofland HB.** Hyperlipidemia, hypercoagulability, and accelerated thrombosis: studies in congenitally hyperlipidemic rats and in rats and monkeys with induced hyperlipidemia. *Blood.* 1976;47:275-286.

320. **van den Eijnden MM., Steenhauer SI., Reitsma PH., Bertina RM.** Tissue factor expression during monocyte-macrophage differentiation. *Thromb. Haemost.* 1997;77:1129-1136.
321. **Novotny WF., Brown SG., Miletich JP., Rader DJ., Broze GJ., Jr.** Plasma antigen levels of the lipoprotein associated coagulation inhibitor in patients samples. *Blood.* 1991;78:387-393.
322. **Mitropoulos KA., Esnouf MP.** Turnover of factor X and of prothrombin in rabbits fed on a standard or cholesterol-supplemented diet. *Biochem. J.* 1987;244:263-269.
323. **Mitropoulos KA., Walter SJ., Meade TW., Esnouf MP.** Increased factor VII reactivity in the rabbit following diet-induced hypercholesterolaemia. *Thromb. Haemost.* 1987;58:273.
324. **Mickelson JK., Lakkis NM., Villarreal-Levy G., Hughes BJ., Smith CW.** Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty : a mechanism for recurrent disease? *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996;28:345-353.
325. **Semeraro N., Montemurro P., Giordano D., Pasquetto N., Curci E., Triggiani R., Colucci M.** Increased macrophage procoagulant activity but normal endothelial thrombomodulin in rabbits fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis.* 1990;20:54-61.
326. **Minor RL., Jr., Myers PR., Guerra R., Jr., Bates JN., Harrison DG.** Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* 1990;86:2109-2116.
327. **Ohara Y., Peterson TE., Harrison DG.** Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* 1993;91:2546-2551.
328. **Tsao PS., Buitrago R., Chan JR., Cooke JP.** Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation.* 1996;94:1682-1689.
329. **Marui N., Offerman MK., Swerlick R., Kunsch C., Rosen CA., Ahmad M., Alexander RW., Medford RM.** Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1992;92:1866-1874.
330. **Creager MA., Gallagher SJ., Girerd XJ., Coleman SM., Dzau VJ., Cooke JP.** L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J. Clin. Invest.* 1992;90:1248-1253.

331. **Otsuji S., Nakajima O., Waku S., Kojima S., Hosokawa H., Kinoshita I., Okubu T., Tamoto S., Takada K., Ishihara T., Osawa N.** Attenuation of acetylcholine-induced vasoconstriction by L-arginine is related to the progression of atherosclerosis. *Am. Heart. J.* 1995;129:1094-1100.
332. **Adams MR., Forsyth CJ., Jessup W., Robinson J., Celermajer DS.** Oral L-arginine inhibits platelet aggregation but does not enhance endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1995;26:1054-1061.
333. **Folkman J., Klagsbrun M.** Angiogenic factors. *Science.* 1987;235:442-447.
334. **Gajdusek CM., Carbon S.** Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium. *J. Cell. Physiol.* 1989;139:570-579.
335. **Navab M., Imes SS., Hama SY., Hough GP., Ross LA., Bork RW., Valente AJ., Berliner JA., Drinkwater DC., Laks H., Fogelman AM.** Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 1991;88:2039-2046.
336. **Schwartz BS., Levy GA., Curtiss LK., Fair DS., Edgington TS.** Plasma lipoprotein induction and suppression of the generation of cellular procoagulant activity in vitro. Two procoagulant activities are produced by peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Invest.* 1981;67:1650-1658.
337. **Schlichting E., Henriksen T., Lyberg T.** Lipoproteins do not modulate the tissue factor activity, plasminogen activator or tumor necrosis factor production induced by lipopolysaccharide stimulation of human monocytes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1994;54:465-473.
338. **Givol D., Yayon A.** Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB. J.* 1992;6:3362-3369.
339. **Hughes SE., Hall PA.** Overview of the fibroblast growth factor and receptor families: complexity, functional diversity, and implications for future cardiovascular research. *Cardiovasc. Res.* 1993;27:1199-1203.
340. **Berardi AC., Wang A., Abraham J., Scadden DT.** Basic fibroblast growth factor mediates its effects on committed myeloid progenitors by direct action and has no effect on hematopoietic stem cells. *Blood.* 1995;86:2123-2129.

341. **Hughes SE., Crossman D., Hall PA.** Expression of basic and acidic fibroblast growth factors and their receptor in normal and atherosclerotic human arteries. *Cardiovasc. Res.* 1993;27:1214-1219.
342. **Vlodavsky I., Folkman J., Sullivan R., Fridman R., Ishai-Michaeli R., Sasse J., Klagsbrun M.** Endothelial cell derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987;84:2292-2296.
343. **Biro S., Yu ZX., Fu YM., Smale G., Sasse J., Sanchez J., Ferrans VJ., Casscells W.** Expression and subcellular distribution of basic fibroblast growth factor are regulated during migration of endothelial cells. *Circ. Res.* 1994;74:485-494.
344. **Roghani M., Moscatelli D.** Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1992;267:22156-22162.
345. **Casscells W., Lappi DA., Olwin BB.** Elimination of smooth muscle cells in experimental restenosis: targeting of fibroblast growth factors receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:7159-7163.
346. **Herbert J-M., Corseaux D., Lalé A., Bernat A.** Hypoxia primes endotoxin-induced tissue factor expression in human monocytes and endothelial cells by PAF-dependent mechanisms. *J. Cell. Physiol.* 1996;169:290-299.
347. **Hansson GK., Chao S., Schwartz SM., Reidy MA.** Aortic endothelial cell death and replication in normal and lipopolysaccharide-treated rats. *Am. J. Pathol.* 1985;121:123-127.
348. **Polunovsky VA., Wendt CH., Ingbar DH., Peterson MS. Bitterman PB.** Induction of endothelial cell apoptosis by TNF α : modulation by inhibitor of protein synthesis. *Exp. Cell. Res.* 1994;214:584-594.

