

UFR des Sciences de la Vie et de la Terre
UNIVERSITE LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I

THESE

Discipline : Sciences du vivant
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée en vue de l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

par

Sabrina GROSS

ROLE DE LA PROSTAGLANDINE E2

DANS L'HEMOSTASE ARTERIELLE ET L'ATHEROTHROMBOSE

Soutenue le 27 novembre 2006 publiquement devant la Commission d'Examen :

Dr. Jean-Marie FREYSSINET

Pr. Michel LAGARDE

Dr. Alain TEDGUI

Pr. Valérie SCHINI-KERTH

Dr. Jean Etienne FABRE

Rapporteur interne

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Examinatrice

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier le Pr. Michel Lagarde ainsi que les Drs. Jean-Marie Freyssinet et Alain Tedgui d'avoir accepté de juger ce travail. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Mme le Pr. Valérie Schini-Kerth pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement le Dr. Jean-Etienne Fabre, mon Directeur de Thèse pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissante pour son soutien et sa confiance. Merci aussi pour votre rigueur de travail (que vous avez su me communiquer, j'en suis persuadée !). Votre passion pour la recherche m'a donné l'envie de faire ce travail.

Je remercie également tous les organismes qui ont financé une partie de ma thèse et pour la confiance qu'ils ont suscitée pour mon projet, à savoir la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose en collaboration avec les laboratoires FOURNIER, le Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose, l'Association pour la Recherche contre le Cancer ainsi que la Fondation pour la Recherche Médicale.

Je tiens à remercier toutes les personnes dont l'aide a permis l'avancement de ce travail, en particulier Jean Luc Vonesch et Didier Hentsch. Merci pour votre disponibilité, votre participation et votre enthousiasme à l'aboutissement de mon projet de thèse. Un grand merci à Serge, Patrick et Jean-Claude mais aussi à l'équipe d'histologie en particulier Patrice, Thomas, Bruno et Isabelle, pour tous vos conseils et à Nadia pour la microscopie électronique.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe : Peggy et Anne-Laure pour les quelques bons moments passés ensemble. Merci à Peggy pour ton soutien lors de mon arrivée au laboratoire.

J'adresse un grand merci à toutes les personnes du second étage que j'ai côtoyées, pour leurs conseils avisés et les bons moments passés ensemble. Notamment Alex, Hala et Jajo, Christelle, Jérôme, Laurent, Malou, Satis et Stéphane. Je n'oublie pas, loin de là ceux qui sont partis : surtout Maud, Bérénice et Sandrine. Ah, une pensée toute particulière aux deux auvergnats : Ma Marie et JC !!!!

Une pensée tout particulière va à mon équipe du midi : Régis, Eric, Vicky, Christelle et Sabrina : la table des vainqueurs !

Merci à tout le personnel des services communs de l'IGBMC et de l'ICS, en particulier à Antoine, Mustapha, Hélène, Evelyne, Maïté, Pascal, Anne-Catherine et enfin Christian et Serge.

J'adresse un grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenue de près ou de loin pendant ces quatre années en dehors du laboratoire, en particulier Claudine et Patrick, Bernadette et Gaston, Fabienne, Nathalie D., Sandra et mes grands-parents. Un chaleureux merci à mon frère, toujours présent quand il faut et à Christophe A. !

Un énorme merci à Nicolas pour ta présence, ton soutien et tes réconforts.

Finalement, cette thèse n'aurait pas vu le jour sans le soutien et la présence de mes parents à qui je la dédie. Encore mille Mercis pour tout ce que vous m'apportez !

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTES DES FIGURES	5
ABREVIATIONS	7

INTRODUCTION GENERALE : La Prostaglandine E2 9

I. La découverte de la prostaglandine E2	10
II. Biosynthèse de la PGE2	10
1. <i>La synthèse de PGE2 : vue d'ensemble</i>	10
2. <i>Les étapes de la synthèse de la PGE2</i>	12
a. Les cyclooxygénases (COX)	12
b. Les PGE synthases ou PGES	13
i. La mPGES-1	14
ii. Les autres PGES	14
3. <i>Transport de la PGE2</i>	15
III. Le mode d'action de la PGE2	16
1. <i>La structure des récepteurs</i>	16
2. <i>Distribution tissulaire des récepteurs EP</i>	18
3. <i>Mode d'action des récepteurs EP</i>	18
a. Les récepteurs EP1 et EP2 - EP4	18
b. Le récepteurs EP3	19
IV. Le large champ d'action de la PGE2	19
V. La PGE2 et les plaquettes : une action biphasique	20
1. <i>La PGE2 et son action inhibitrice sur l'agrégation plaquettaire</i>	20
2. <i>La PGE2 et son action facilitatrice sur l'agrégation plaquettaire</i>	21
3. <i>Etude de l'action de la PGE2 in vivo ?</i>	24

PARTIE I : Rôle de la PGE2 dans l'homéostasie artérielle 27

INTRODUCTION 28

I. L'homéostasie artérielle	29
1. <i>Définition de l'homéostasie</i>	29
2. <i>Composantes de l'homéostasie artérielle</i>	29
a. Le tonus vasculaire	29
b. La balance hémostatique	30
II. L'hémostase physiologique	30
1. <i>L'endothélium vasculaire</i>	30

a.	Description de l'endothélium	30
b.	Le monoxyde d'azote : NO	31
c.	La prostacycline : PGI2	31
2.	Les plaquettes	32
a.	Description de la plaquette	32
b.	Le thromboxaneA2 : TXA2	32
3.	Le modèle actuel : Une balance entre agents anti et pro-agrégants	33
III.	Influence de l'inflammation vasculaire sur l'hémostase artérielle	33
1.	Inflammation et thrombose	34
a.	Influence de l'inflammation sur l'endothélium qui devient pro-agrégant.....	34
i.	Influence de l'inflammation sur le NO	34
ii.	Influence de l'inflammation sur la PGI2.....	35
iii.	Autres influences de l'inflammation sur l'endothélium.....	35
b.	Influence de l'inflammation sur les plaquettes	36
i.	Effet de l'inflammation sur les capacités adhésives des plaquettes.....	36
ii.	Les agonistes alors en présence.....	37
✓	La thrombine	37
✓	Le TXA2	38
✓	Le collagène	38
✓	L'ADP	38
2.	Maladies inflammatoires vasculaires	39
IV.	Hypothèses de travail	40
RESULTATS	42
I.	Production de PGE2 par la paroi artérielle	43
II.	Modulation de la thrombose artérielle par l'activation du récepteur EP3 de la PGE2	45
1.	Le modèle de thrombose artérielle induite par AA	45
a.	Caractérisation du modèle	45
b.	Rôle de la PGE2 dans la thrombose artérielle induite par AA.....	48
i.	Détection visuelle.....	48
ii.	Quantification.....	49
2.	Modulation de la thrombose par le couple PGE2/EP3 dans un modèle de dénudation endothéliale	52
III.	Mode d'action du couple PGE2/EP3 dans la thrombose artérielle	53
1.	La PGE2 plaquettaire joue-t-elle un rôle dans la thrombose artérielle ?	53
2.	La PGE2 est-elle la seule molécule à agir sur le récepteur EP3 ?	54
3.	Quel récepteur EP3 est en jeu dans la thrombose artérielle ?	57
IV.	Conclusion	60

Partie II : Rôle de la PGE2 dans la thrombogénicité de la plaque d'athérosclérose	61
--	----

INTRODUCTION	62
---------------------------	----

I. La plaque d'athérosclérose mature : vue mécanistique de sa formation	63
1. <i>L'infiltration accrue des lipides et leur oxydation</i>	63
2. <i>Invasion de la lésion par les macrophages : bénéfique ou délétère ?</i>	64
3. <i>L'amplification de l'inflammation ?</i>	65
4. <i>Une capsule pour isoler et contenir la lésion</i>	66
5. <i>Sclérose de la plaque</i>	66
II. L'athérothrombose	66
1. <i>Définition de l'athérothrombose</i>	67
2. <i>La rupture de la plaque</i>	68
a. Vulnérabilité de la plaque.....	68
i. Définition de la vulnérabilité.....	68
ii. Les causes de la vulnérabilité.....	68
✓ L'apoptose.....	69
✓ La néovascularisation.....	69
✓ La dégradation de la matrice extracellulaire	69
b. Les forces physiques (qui entraînent la rupture de la plaque vulnérable).....	70
3. <i>La thrombogénicité de la plaque</i>	70
a. Importance du collagène.....	70
b. Présence du facteur tissulaire	71
c. Les autres facteurs pro-agrégants	72
4. <i>Imprédictibilité de l'athérothrombose</i>	72
a. Chez l'homme : les données cliniques	72
b. Chez l'homme : les données histologiques	73
c. Chez la souris	74
III. Hypothèse : L'inflammation de la plaque module l'athérothrombose.	76

RESULTATS	79
------------------------	----

I. Production de PGE2 par la plaque d'athérosclérose	80
II. La PGE2 produite par la plaque est fonctionnelle.	81
1. <i>Etudes in vitro</i>	81
2. <i>Etude in vivo</i>	84
a. Procédure	84
b. Résultats	85
III. Rôle de la PGE2 dans l'athérothrombose sur rupture de plaque.	88
1. <i>Modèles d'induction de rupture de plaque</i>	88
a. Le ballonning.....	88
b. L'utilisation de pinces	89
c. Constitution d'une lésion superficielle par griffure.....	90

2.	<i>La rupture de la plaque entraîne une thrombose EP3 dépendante</i>	92
3.	<i>Effet de l'augmentation de la PGE2 intra-plaque sur l'athérombose</i>	93
PUBLICATION		95
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		96
I.	Discussion	97
1.	La PGE2 : un nouveau lien inflammation-thrombose in vivo	97
2.	Confrontation aux données de la littérature	98
a.	Influence du niveau de PGE2 sur l'hémostase artérielle.....	98
b.	La PGE2 dans la plaque et dans l'athérombose.....	98
3.	L'intérêt de la présente étude	99
a.	La PGE2 est bénéfique sur la paroi artérielle saine.....	99
b.	La PGE2 est nocive sur la paroi artérielle malade	100
4.	Limites des données	101
5.	Conclusions	101
II.	Perspectives	101
BIBLIOGRAPHIE		104

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE : La Prostaglandine E2

Figure 1: La voie de biosynthèse des prostanoïdes.....	11
Figure 2: Production de PGE2 par la COX-2 en situation inflammatoire	12
Figure 3: Couplage préférentiel de la mPGES-1 avec la COX-2.....	14
Figure 4: Couplage préférentiel de la cPGES avec la COX-1	15
Figure 5: Exemple de structure d'un récepteur EP : le récepteur EP3	17
Tableau 1: Signal de transduction par les récepteurs EP de la PGE2.....	17
Figure 6: Action anti-agrégante non spécifique de la PGE2.....	21
Figure 7: La PGE2 amplifie l'agrégation plaquettaire induite par de faibles concentrations.....	22
d'agonistes	
Figure 8: Expression plaquettaire (RT-PCR) de quelques récepteurs prostanoïdiens	22
Figure 9: La PGE2 potentialise l'agrégation plaquettaire via EP3	23
Figure 10: Transduction du signal du couple PGE2/EP3 dans les plaquettes.....	24
Figure 11: Implication <i>in vivo</i> du couple PGE2/EP3 dans la survenue de thrombose.....	25

PARTIE I : Rôle de la PGE2 dans l'homéostasie artérielle

Figure I-1: Hypothèse de travail	41
Figure I-2: Détection tissulaire de PGE2 en réponse à une inflammation locale.....	43
Figure I-3: Détection tissulaire de PGE2 en réponse à une inflammation systémique	44
Figure I-4: Evaluation visuelle de la thrombose artérielle par une échelle de score	45
Figure I-5: Le modèle de thrombose artérielle inflammatoire induite par AA.....	46
Figure I-6: Importance du modèle de thrombose artérielle induite par AA	47
Figure I-7: Implication de la PGE2 dans la thrombose artérielle induite par AA	48
Figure I-8: Quantification de la thrombose artérielle par la macroscopie à fluorescence	50
Figure I-9: La thrombose artérielle induite par AA est EP3 dépendante	51
Figure I-10: La thrombose induite par FeCl3 est EP3 dépendante.....	52
Figure I-11: L'agrégation de plaquettes activées n'est pas amplifiée par la PGE2 plaquettaire	54
Figure I-12: La thrombose artérielle induite par impulsion laser n'est pas PGE2 dépendante ..	55
Figure I-13: Modèle étudié pour déterminer le récepteur EP3 mis en jeu dans la thrombose artérielle	58
Figure I-14: Importance de la thrombose induite par délivrance péri-adventitielle d'AA en fonction du récepteur plaquettaire EP3	59
Figure I-15: Conclusion de la première partie.....	60

Partie II : Rôle de la PGE2 dans la thrombogénicité de la plaque d'athérosclérose

Figure II-1: Genèse de la plaque d'athérosclérose	64
Figure II-2: Athérothrombose.....	67
Figure II-3: Thrombogénicité de la plaque d'athérosclérose due à la présence de collagène....	71
Figure II-4: Exemples d'athérothrombose de plaques rompue, érodée et réparée	75

Figure II-5: Détection de COX-2 dans les plaques d'athérosclérose humaines en co-localisation avec les macrophages.....	76
Figure II-6: Co-localisation COX-2 et mPGES-1 au sein des plaques d'athérosclérose humaines.....	77
Figure II-7: 2 ^{ème} Hypothèse de travail.....	78
Figure II-8: Dosage tissulaire de la PGE2 dans des plaques d'athérosclérose murine.....	81
Figure II-9: Activation du récepteur plaquettaire EP3 par des homogénats de plaque d'athérosclérose.....	82
Figure II-10: Seule la PGE2 intra-plaque agit sur le récepteur EP3 plaquettaire.....	83
Figure II-11: Chambre d'incubation d'une plaque d'athérosclérose carotidienne.....	84
Figure II-12: La PGE2 intra-plaque, dont la production a été forcée par l'exposition de la plaque à l'AA, active son récepteur plaquettaire EP3.....	86
Figure II-13: Aires des plaques aortiques chez des souris <i>ApoE^{-/-}Ep3^{+/+}</i> et <i>ApoE^{-/-}Ep3^{-/-}</i>	87
Figure II-14: Technique du balloning.....	89
Figure II-15: Utilisation de forceps.....	90
Figure II-16: Modèle de rupture de la plaque.....	91
Figure II-17: Exemples de ruptures induites à la surface des plaques murines.....	91
Figure II-18: Athérombose dépendante du récepteur EP3.....	92
Figure II-19: Aggravation de l'athérombose.....	93
Figure II-20: Conclusion de la deuxième partie.....	94

ABREVIATIONS

Listes des principales abréviations

AA :	<u>A</u> cide <u>a</u> rachidonique
AC :	<u>A</u> dénylate <u>c</u> yclase
ADP :	<u>A</u> dénosine <u>d</u> iphosphate
AM :	<u>A</u> céto <u>x</u> méthyl
AMPc :	<u>A</u> dénosine <u>m</u> onophosphate <u>c</u> yclique
ATP :	<u>A</u> dénosine <u>t</u> riphosphate
Ca²⁺ :	<u>C</u> alcium
CD40L :	<u>L</u> igand du <u>CD40</u>
COX :	<u>C</u> ycloo <u>x</u> ygénase
CMLV :	<u>C</u> ellules <u>m</u> usculaires <u>l</u> isses <u>v</u> asculaires
cPGES :	<u>P</u> rostaglandine <u>s</u> ynthase <u>E2</u> de type <u>c</u> ytosolique
EDRF :	<u>E</u> ndothelium <u>R</u> elaxing <u>F</u> actor
eNOS :	<u>E</u> ndothelial <u>N</u> itric <u>O</u> xide <u>S</u> ynthase
EP :	Récepteur de la prostaglandine de série <u>E2</u>
FeCl₃ :	<u>C</u> hlorure de <u>f</u> er (<u>III</u>)
FT :	<u>F</u> acteur <u>t</u> issulaire
GMPc :	<u>G</u> uanosine <u>m</u> onophosphate <u>c</u> yclique
Gp :	<u>G</u> lycoprotéine
GST :	<u>G</u> lutathione <u>S</u> <u>T</u> ransférase
HFD :	<u>H</u> igh <u>F</u> at <u>D</u> iet
HSP :	<u>H</u> eat <u>s</u> hock protein
Il :	<u>I</u> nter <u>l</u> eukine
iNOS :	<u>I</u> nducible <u>N</u> itric <u>O</u> xide <u>S</u> ynthase
IP :	Récepteur de la prostaglandine de série <u>I</u>
LDL :	<u>L</u> ow <u>D</u> ensity <u>L</u> ipids
MCP-1 :	<u>M</u> onocyte <u>c</u> hemotactic protein 1
MMPs :	<u>M</u> étalloprotéases <u>m</u> atricielles
m-PGES :	<u>P</u> rostaglandine <u>s</u> ynthase <u>E2</u> de type <u>m</u> icrosomale
NO :	Monoxyde d'azote
OPN :	<u>O</u> stéopontine

P_{ANOVA}	<i>ANalysis Of VAriance</i>) est une technique statistique permettant de comparer les moyennes de plus de deux populations
PAR :	<u>P</u> rotease <u>a</u> ctivated <u>r</u> eceptor, récepteurs de la thrombine
PGD2 :	<u>P</u> rostaglandine <u>D</u> 2
PGE2 :	<u>P</u> rostaglandine <u>E</u> 2
PGES :	<u>P</u> rostaglandine <u>E</u> 2 synthase
PGG2 :	<u>P</u> rostaglandine <u>G</u> 2
PDGF :	<u>P</u> latelet <u>d</u> erived <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
PGH2 :	<u>P</u> rostaglandine <u>H</u> 2
P2Y1 ou P2Y12 :	Récepteurs de l'ADP
PGI2 :	Prostacycline ou <u>p</u> rostaglandine <u>I</u> 2
PKA :	<u>P</u> rotéine <u>k</u> inase <u>A</u>
PLA2 :	<u>P</u> hospholipase <u>A</u> 2
PLC :	<u>P</u> hospholipase <u>C</u>
Pw :	Test de probabilité de « Student » corrigé par « Welch » permettant de tester deux groupes dont les variances sont significativement différentes
oxLDLs :	LDL oxydés
TFPI :	<u>T</u> issue <u>F</u> actor <u>P</u> athway <u>I</u> nhibitor, Inhibiteur du FT
Th :	Cellules <u>T</u> helper
Treg :	Cellules <u>T</u> régulatrices
TP :	Récepteur du <u>t</u> hromboxane
TXA2 :	<u>T</u> hromboxane <u>A</u> 2
V-CAM :	<u>V</u> ascular <u>C</u> ell <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule
vWF :	<u>V</u> on <u>W</u> illebrand <u>F</u> actor

Listes des principales abréviations de gènes

ApoE :	Apolipoprotéine
Cox:	Cyclooxygénase
Ep3 :	Récepteur EP3 de la PGE2
P2Y1 :	Récepteur de l'ADP

INTRODUCTION GENERALE

La Prostaglandine E2

I. La découverte de la prostaglandine E2

Dès 1934, Von Euler identifie dans le sperme un composé lipidique soluble qu'il appelle « prostaglandine », qui, une fois injectée à des animaux stimule les contractions du muscle utérin et diminue la pression artérielle¹. En 1960, Bergström et Sjovall isolent à partir de prostates de brebis la « prostaglandine de série E » (PGE), acide gras de 20 carbones. Sa structure est élucidée quatre ans plus tard, identifiant la PGE2 comme métabolite de l'acide arachidonique (AA). A la différence de certaines autres prostaglandines dérivant de l'AA, la PGE2 n'est pas instable.

Dans l'organisme, la PGE2 n'est pas produite par un organe endocrinien spécifique. Elle est synthétisée dans de nombreux tissus où elle agit comme une hormone locale^{2,3}. Sa stabilité lui confère une durée de vie tissulaire relativement longue. Par contre, dès qu'elle atteint le flux sanguin, elle est rapidement dégradée lors de son premier passage dans le tissu pulmonaire.

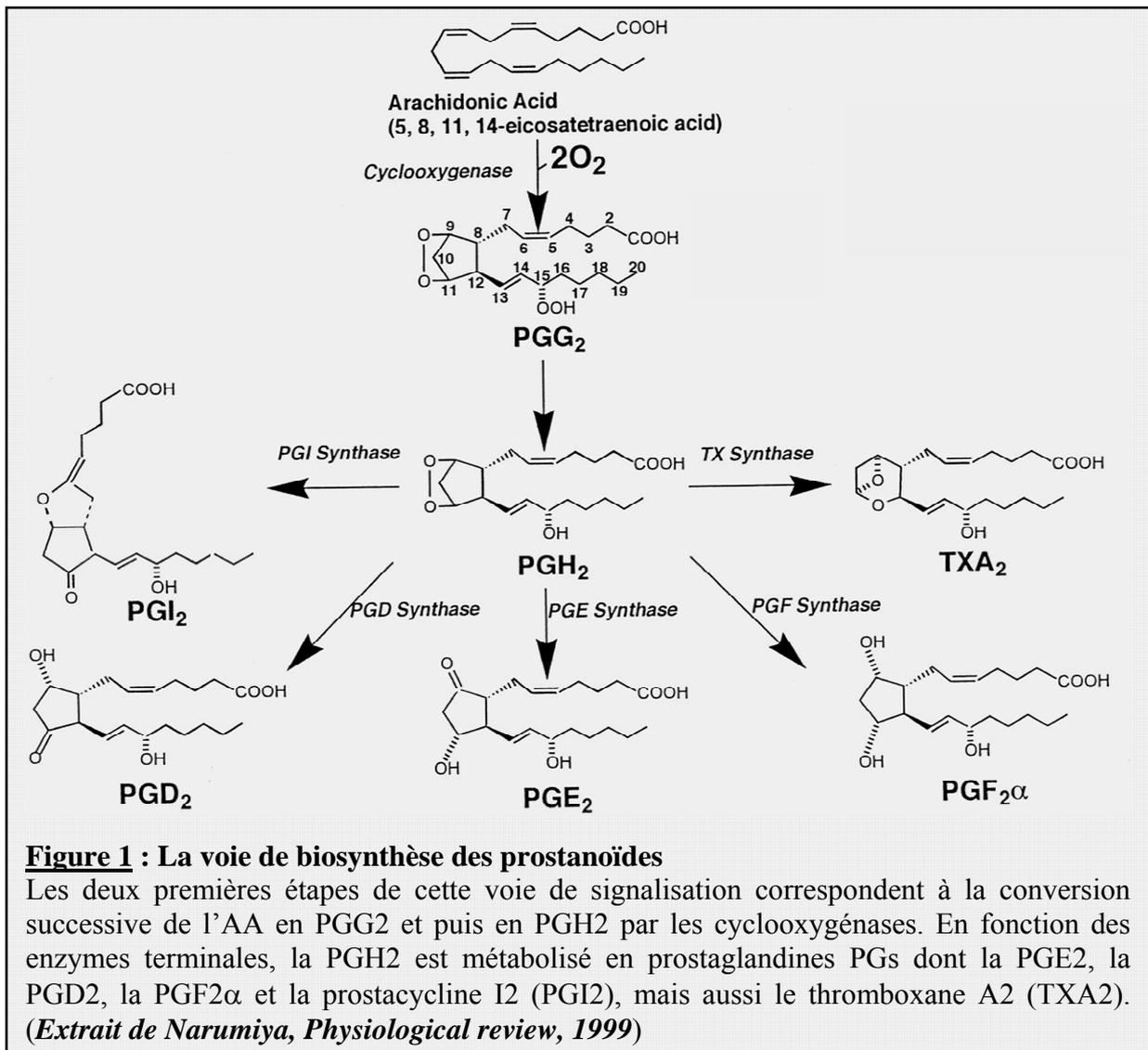
II. Biosynthèse de la PGE2

La PGE2 appartient à la famille des eicosanoïdes, famille qui englobe les composés lipidiques oxygénés dont la chaîne carbonée possède 20 carbones.

1. La synthèse de PGE2 : vue d'ensemble

Le précurseur de la PGE2 est l'AA (acide 5, 8, 11, 14 eicosatétraoïque). L'AA, acide gras polyinsaturé de 20 carbones est stocké sous forme estérifiée dans les membranes en position *sn2* ('*stereonumber 2*' c'est-à-dire 2^{ème} carbone du groupement glycérol du phospholipide) de glycérophospholipides membranaires. La biosynthèse de PGE2 résulte de trois réactions enzymatiques. L'étape initiale est une libération de l'AA à partir des membranes cellulaires par l'action hydrolytique des phospholipases. En réponse aux stimuli inflammatoires, la phospholipase A2 (PLA2) se mobilise vers la membrane pour libérer de façon directe l'AA. D'autres phospholipases C (PLC) ou D (PLD) peuvent aussi agir mais de façon indirecte, en deux étapes. Le devenir de l'AA est alors triple. Métabolisé par les lipoxigénases, l'AA est transformé en leucotriènes ou en dérivés mono-, di-, ou tri- hydroxyacides. Métabolisé par les

époxygénases dépendantes du cytochrome P450 l'AA est transformé en époxydes. Métabolisé par les cyclo-oxygénases (COX), l'AA est séquentiellement oxydé en prostaglandine G2 (PGG₂) et transformé en un intermédiaire lipidique instable, la PGH₂. Ce dernier composé est rapidement converti en divers prostanoides (**Figure 1**) : les prostaglandines D₂ (PGD₂), F_{2α} (PGF_{2α}) ou E₂ (PGE₂), la prostacycline I₂ (PGI₂) et le thromboxane A₂ (TXA₂). La synthèse finale de la PGE₂ est sous le contrôle d'enzymes terminales spécifiques dont l'expression varie en fonction du type cellulaire.



2. Les étapes de la synthèse de la PGE2

a. Les cyclooxygénases (COX)

Les COX catalysent les deux réactions enzymatiques que sont la bisoxygénation de l'AA en PGG2 et la réduction de la PGG2 en PGH2. Il existe trois isoformes différentes de la COX appelées COX-1, COX-2 et COX-3. La COX-3, un variant de la COX-1, se localise principalement dans le cerveau mais aussi dans le tissu cardiaque⁴. La COX-1 et la COX-2 sont plus largement distribuées. Ces deux isoformes ont 60% d'homologie dans leur séquence protéique⁵. Même si la COX-1 et la COX-2 peuvent co-exister dans une même cellule, le niveau d'expression des gènes *Cox-1* et *Cox-2* est régulé par les conditions dans lesquelles se trouve la cellule. La nature de la COX effectrice dépend donc de la cellule, de l'état de la cellule et de son environnement.

La COX-1 est exprimée de façon constitutive dans un large panel de cellules, mais son expression pourrait quand même être induite⁶. Il a été montré que son activité peut être modulée par des stress inflammatoires. Ainsi, la stimulation de macrophages par du LPS augmente l'activité enzymatique de la COX-1, et augmente ainsi la production de la PGE2 sans modifier l'expression de la COX-1 (**Figure 2**, panel A, temps 1h)⁷.

Dans les macrophages, la production des prostaglandines par la COX-1 est large, c'est-à-dire que toutes les prostaglandines sont représentées sur le profil HPLC⁸ (**Figure 2**, panel B).

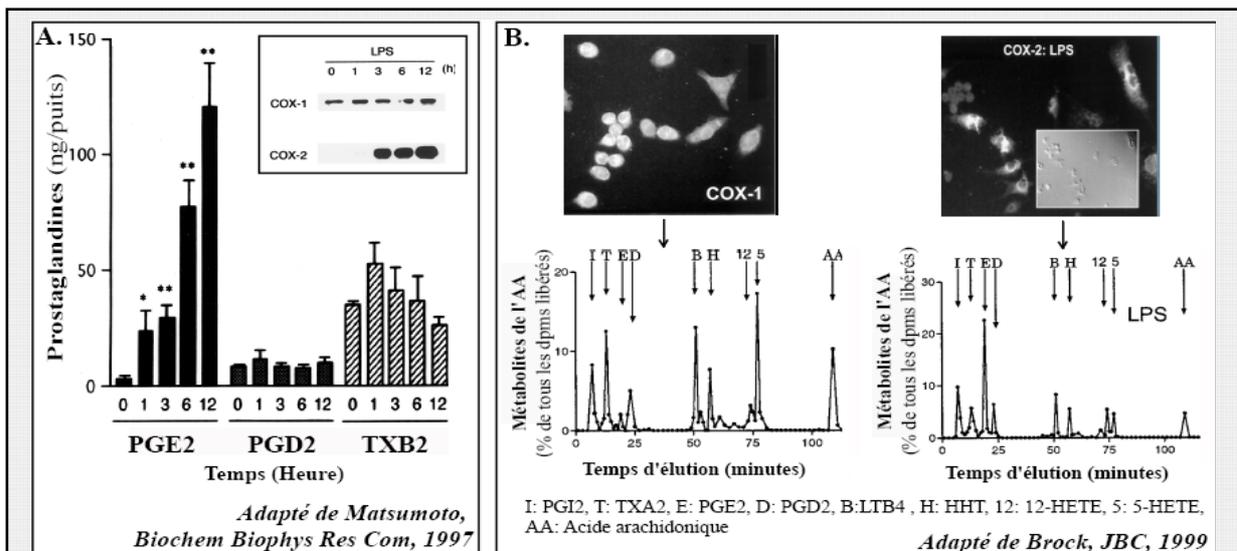


Figure 2 : Production de PGE2 par la COX-2 en situation inflammatoire

La production de la PGE2 dans des conditions basales où la COX-1 prédomine est minimale par rapport au TXA2 ou à la PGD2 (T ou D panel **B**, respectivement) (**A** et **B**). Une inflammation augmente la synthèse de la PGE2 par la COX-1 dans un premier temps (**A**) puis le profil des prostanoides est restreint à la seule PGE2 par la COX-2 (**B**).

L'expression de la COX-2 est induite en réponse à des stimuli inflammatoires. Cette sur-expression de la COX-2 en réponse à un traitement par lipopolysaccharide (LPS) modifie le profil de production des prostaglandines. Ainsi, par exemple, le rapport entre la PGI₂ et la PGE₂ s'inverse en faveur de la production largement prédominante et soutenue de PGE₂^{8,7} (**Figures 2**, panels A et B). Cette production préférentielle de la PGE₂ par la COX-2 suggère une interaction privilégiée de la COX2 avec une enzyme terminale de synthèse de la PGE₂.

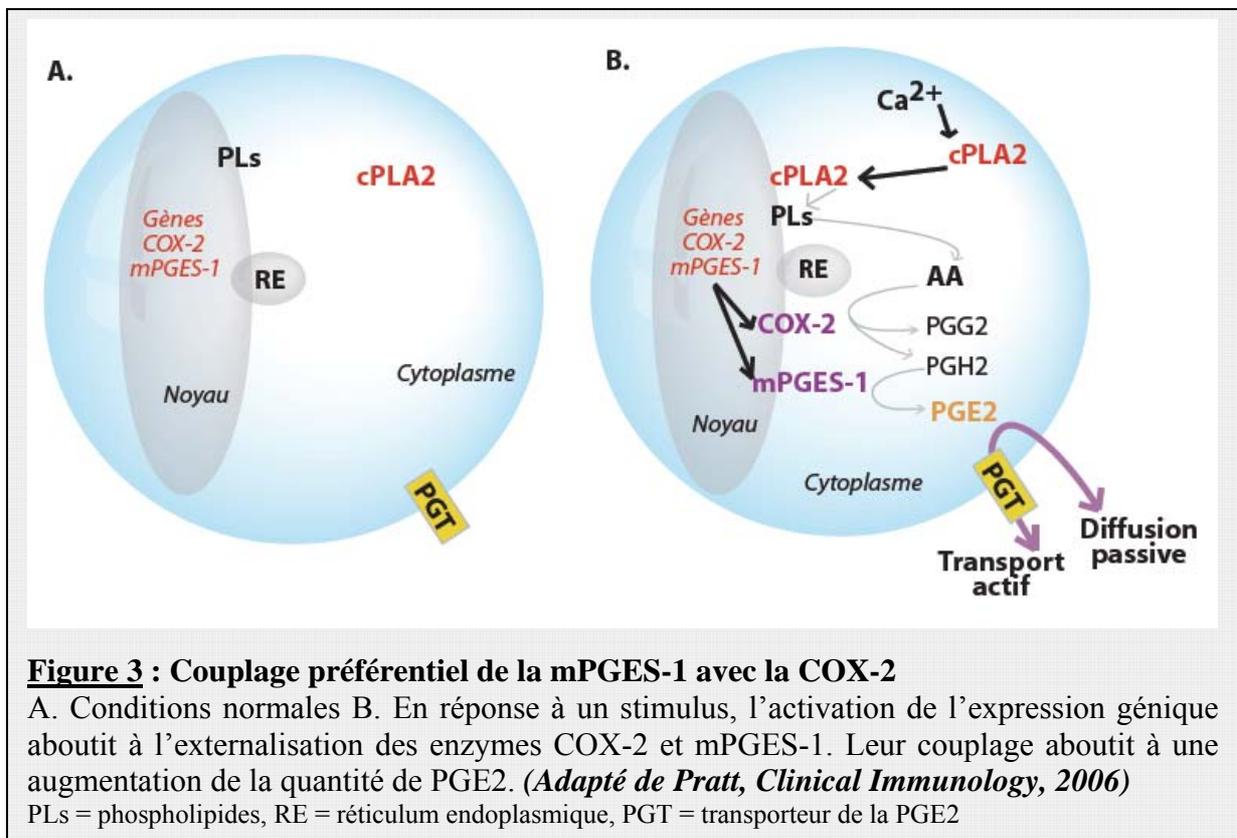
La raison de la différence de production de la PGE₂ par la COX-1 et la COX-2 n'a pas encore été élucidée mais il apparaît évident que les deux isoformes ont des fonctions indépendantes⁹. Des explications possibles sont basées sur leurs différences de localisation cellulaire ou de propriétés enzymatiques. La COX-1 se localise au niveau du réticulum endoplasmique ou dans la région périnucléaire alors que la COX-2 réside principalement dans la région périnucléaire. En plus, le fonctionnement de chacune des deux enzymes dépend de la concentration en AA¹⁰. La COX-2 serait plus efficace à basses concentrations d'AA, à l'inverse de la COX-1¹¹, qui serait plus active lorsque l'AA est apporté de façon exogène ou relargué lors d'inflammation aigüe ou de lésion cellulaire. En conséquent, il n'est pas exclu que la COX-1 soit responsable de la génération de PGE₂ lors des phases précoces d'inflammation, avant l'induction de la COX-2⁷, comme le montre la **figure 2A** (temps 1h). Ceci laisse bien évidemment ouverte la possibilité que la COX-1 soit inductible et/ou soit capable d'interagir avec l'enzyme terminale de synthèse de la PGE₂, préférentiellement couplée à la COX-2¹⁰.

b. Les PGE synthases ou PGES

L'enzyme terminale de synthèse de la PGE₂ est la PGE synthase (PGES), isolée pour la première fois à partir de vésicules séminales^{12,13}. Le séquençage de la PGES humaine a permis la caractérisation de trois types différents de PGES¹⁴: la mPGES-1, membranaire ou microsomale^{15,16}, la cPGES, cytosolique¹⁷ et la mPGES-2¹⁸. Les enzymes mPGES-1 et cPGES appartiennent à la famille des « Glutathion - S transférases » (GST) dont le degré d'activation est dépendant de la présence de la glutathione. A l'inverse, l'activité de la mPGES-2 est indépendante de ce cofacteur mais est aussi activée par la présence d'autres agents réducteurs SH.

i. La mPGES-1

Le rôle de la mPGES-1 dans l'inflammation a été établi en montrant que des souris invalidées pour le gène codant pour la *mPGES-1* répondent moins bien aux stimuli inflammatoires, douloureux ou tumorigènes¹⁹. La mPGES-1, dont l'expression est stimulée par l'inflammation, se couple de façon préférentielle à l'isoforme inducible COX-2²⁰, bien que ce couplage soit non exclusif²¹ (**Figure 3**). Ces enzymes sont toutes deux localisées dans la région périnucléaire et de plus, une co-localisation tissulaire entre la COX-2 et la mPGES-1 a été relevée dans des pathologies inflammatoires humaines^{22,23}.



ii. Les autres PGES

Les autres PGES sont toutes exprimées de façon constitutive et sont présentes dans le cytosol de la cellule : il s'agit de la cPGES, la mPGES-2 et la classe μ des GSTs.

La cPGES joue un rôle dans l'homéostasie cellulaire et peut synthétiser rapidement la PGE2. Dans ce cas, sa translocation du cytosol vers la région périnucléaire lui permet de s'assembler

à la COX-1 pour produire de PGE2²⁴ (**Figure 4**). Son activation requière sa liaison à la protéine HSP90 et sa phosphorylation par la protéine « casein kinase 2 »²⁵.

La mPGES-2, exprimée dans les tissus où l'expression de la mPGES-1 est faible, peut se coupler soit à la COX-1 soit à la COX-2, en fonction de l'environnement de la cellule. Son action nécessite l'élimination de sa partie N terminale indispensable à sa maturation.

Enfin, la nouvelle forme cytosolique de la PGES découverte dans le cortex cérébral est la classe μ des GST et intervient probablement dans la production de PGE2 dans des zones restreintes du cerveau.

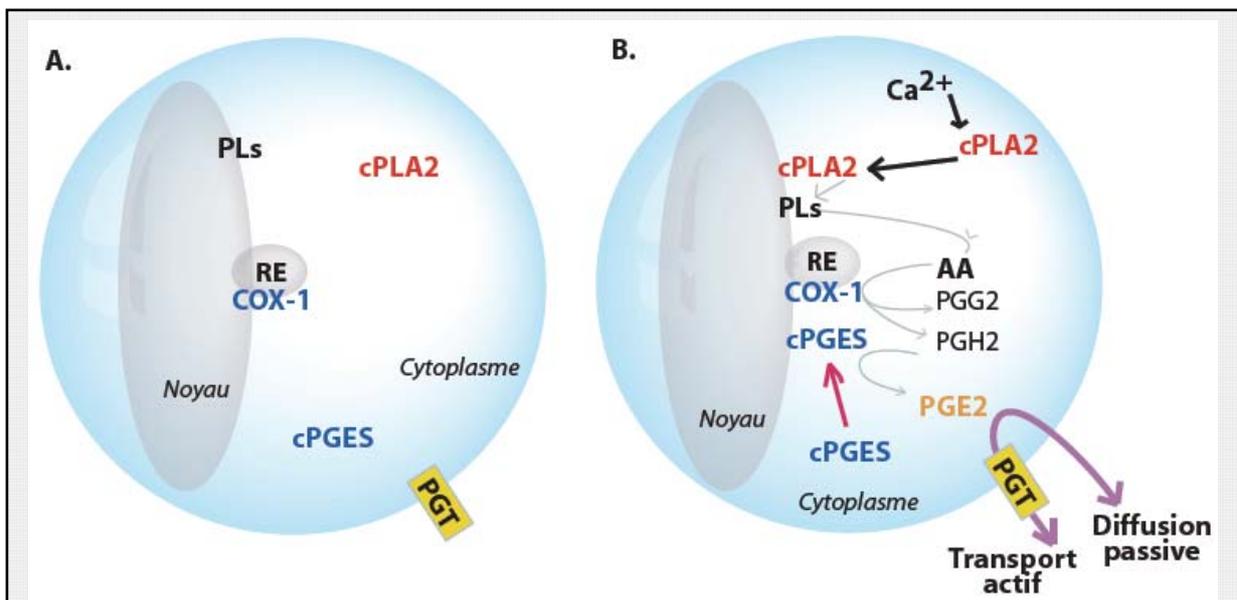


Figure 4 : Couplage préférentiel de la cPGES avec la COX-1

A. Conditions normales **B.** En réponse à un stimulus, la cPGES présente constitutivement dans le cytosol de la cellule se transloque vers la région périnucléaire où la production de la PGE2 a lieu en couplage avec la COX-1. (*Adaptée de Pratt, Clinical Immunology, 2006*)

PLs = phospholipides, RE = réticulum endoplasmique, PGT = transporteur de la PGE2

Ainsi, les interactions COX/PGES impliquent des couplages préférentiels entre les isoformes COX-1, COX-2 et les PGES¹⁰. La production de PGE2 est donc conditionnée par le type cellulaire concerné ainsi que par le besoin de la cellule

3. Transport de la PGE2

Nouvellement synthétisée, la PGE2 doit pouvoir atteindre ses cellules cibles et pour cela elle doit pouvoir franchir les membranes phospholipidiques. Malgré sa nature lipidique, la PGE2

le plus souvent sous forme anionique est repoussée par les charges négatives de la membrane, ce qui entrave sa diffusion passive²⁶. La PGE2 franchit également les membranes grâce à un transporteur actif, le PGT (échangeur anionique lactate/PGE2)^{27,28,29} (**Figures 3 et 4**), en association avec la protéine MRP4³⁰.

III. Le mode d'action de la PGE2

La PGE2 exerce de nombreuses fonctions dans l'organisme, suggérant l'existence de plusieurs récepteurs spécifiques. Après la découverte initiale d'un récepteur de la PGE2 en 1972³¹, les études pharmacologiques ont identifié quatre récepteurs EP pour la PGE2 : EP1, EP2, EP3, EP4^{32,33,24}. L'existence de ces récepteurs et leurs rôles respectifs dans les diverses fonctions de la PGE2 ont été confirmés par leur clonage moléculaire et la génération de souris invalidées pour chacun d'eux.

1. La structure des récepteurs

Les récepteurs EP sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui appartiennent à la superfamille des récepteurs type « rhodopsine » couplés aux protéines hétérotrimériques G (**Figure 5**). Les quatre gènes codant pour les récepteurs EP sont différents. Un alignement de séquence entre les récepteurs EP révèle une faible homologie de séquence, de l'ordre d'environ 20 à 30%²⁴. Quelques résidus amino-acides sont conservés, localisés principalement dans les parties transmembranaire et dans la seconde boucle extracellulaire des récepteurs, correspondant au site de reconnaissance pour la PGE2^{34,35,36} (**Figure 5**). La diversité des récepteurs est due à des variations de l'extrémité cytosolique C terminale qui les couple à des protéines G différentes^{36,37}, et explique leurs fonctions différentes (**Tableau 1**). Un épissage alternatif de cette partie C terminale aboutit à la formation d'isoformes distinctes. Le récepteur EP3 se distingue des autres récepteurs par les huit isoformes humaines différentes qui résulte d'un épissage alternatif^{38,39} et par les trois isoformes murines⁴⁰.

Ainsi, la diversité des actions de la PGE2 est basée sur l'existence de quatre récepteurs et augmentée par les isoformes fonctionnelles de EP3. Elle résulte également d'une distribution tissulaire variable de ces récepteurs.

2. Distribution tissulaire des récepteurs EP

Chaque récepteur est spécifiquement distribué dans l'organisme et leur niveau d'expression est variable selon les tissus. Le récepteur EP1 se localise dans divers organes tels que le rein, le poumon, l'estomac ou encore le neurone⁴¹. Le récepteur EP2, le moins abondamment distribué, se localise principalement dans l'utérus⁴² où il intervient dans l'implantation utérine. Il est également exprimé au niveau des voies respiratoires où il relâche les cellules musculaires bronchioliques⁴³. Les récepteurs EP3 et EP4 sont les plus largement distribués dans l'organisme^{44,45} notamment dans le rein, le système nerveux central, le système digestif, l'utérus et les plaquettes humaines⁴⁶.

3. Mode d'action des récepteurs EP

La transduction du signal par les récepteurs EP a été déterminée en fonction de la réponse de seconds messagers comme l'AMPc, le calcium intracellulaire ou encore l'inositol triphosphate. Pour ces études, des cellules dont l'expression du récepteur étudié est nulle sont transfectées avec le récepteur en question, qui permet d'identifier la voie de signalisation mise en jeu et notamment la protéine G activée par ce récepteur. Les caractéristiques de chaque récepteur peuvent alors être établies.

a. Les récepteurs EP1 et EP2 - EP4

L'activation de la protéine Gq par le couple PGE2/EP1 provoque une augmentation intracellulaire de Ca²⁺⁴⁷ via la voie phospholipase C (PLC)-inositol triphosphate (IP3), bien qu'il ait été suggéré que cette augmentation de Ca²⁺ puisse être indépendante de la voie de la PLC²⁴ (**Tableau 1**).

Quant aux récepteurs EP2 et EP4, ils sont couplés à la protéine Gs qui stimule l'adénylate cyclase (AC), augmente la production d'AMPc et active la protéine kinase A (PKA)⁴⁸

(**Tableau 1**). La PKA, quant à elle active alors des facteurs de transcription et stimule l'expression de certains gènes.

Ces multiples actions sont dépendantes de la distribution cellulaire et du niveau d'expression des récepteurs EPs. Notamment, les récepteurs EPs possèdent des sites de phosphorylation intra-cellulaires qui une fois phosphorylés désensibilisent le récepteur en question ce qui diminue son degré d'activation. C'est ainsi que le récepteur EP4 est très rapidement désensibilisé après son activation⁴⁹.

b. Le récepteurs EP3

La voie de signalisation activée par EP3, identifiée pharmacologiquement dans l'épithélium rénal est l'inhibition de l'AC via la protéine Gi, résultant en une diminution de production d'AMPC⁵⁰ et une activation de la voie MAP Kinase⁵¹ (**Tableau 1**). Cette voie de signalisation n'est pas univoque, puisque l'une des isoformes du récepteur EP3, le récepteur EP3 γ peut se coupler à une protéine G stimulatrice ou une inhibitrice à la différence des isoformes EP3 α et β ⁴⁰.

Ces études pharmacologiques assignent des voies de signalisation cellulaire spécifiques pour chaque récepteur EP. Mais, ces données ont été acquises *in vitro* avec des systèmes cellulaires spécifiques, et ne suffisent pas forcément pour décrire la réalité physiologique.

IV. Le large champ d'action de la PGE2

La PGE2 intervient dans des systèmes fonctionnels aussi variés que la digestion, l'élimination des métabolites, la reproduction, le développement, le système nerveux et est impliquée dans des processus physiopathologiques comme le cancer.

Dans le rein, la PGE2 régule la réabsorption d'eau⁵² ainsi que la pression de la perfusion rénale³⁷ en intervenant dans la production de rénine⁵³. Elle joue aussi un rôle dans le contrôle du tonus des cellules musculaires lisses vasculaires^{54,55,56}, et modifie les conditions rhéologiques locales. La PGE2 agit dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse gastrique

contre l'acidité luminale⁵⁷. Un rôle constricteur de la PGE2 est évoqué au niveau des cellules musculaires des voies respiratoires.

Dans la reproduction, elle agit dans l'inhibition de la lutéolyse^{14,58}, l'implantation du blastocyste^{59,60} et sa survie^{61,62,63}. La PGE2 est également impliquée dans le déclenchement de l'accouchement⁶⁴ et est responsable de la fermeture du canal artériel lors des premiers mouvements respiratoires du nouveau-né⁶⁵.

Au niveau du système nerveux, la PGE2 est impliquée dans la douleur^{66,67,68}, la transmission des signaux nociceptifs, et contrôle la survenue de la fièvre^{69,70}.

La PGE2 joue un rôle prépondérant dans les réponses inflammatoires. D'une part, elle contrôle la prolifération de la moëlle osseuse^{71,72} et donc le nombre de cellules myéloïdes produites. D'autre part, la PGE2 stimule la production de chemokines par les macrophages⁷³ et régule la production de lymphokines par les cellules T⁷⁴. La PGE2 est un médiateur inflammatoire^{68,75}, produit par les monocytes activés^{76,8}, et elle est effectivement mise en évidence dans diverses maladies humaines inflammatoires¹⁰, liées à l'âge⁷⁷, ou encore cancéreuses⁷⁸.

Enfin, et surtout pour notre propos, la PGE2 participe à la régulation de la fonction plaquettaire.

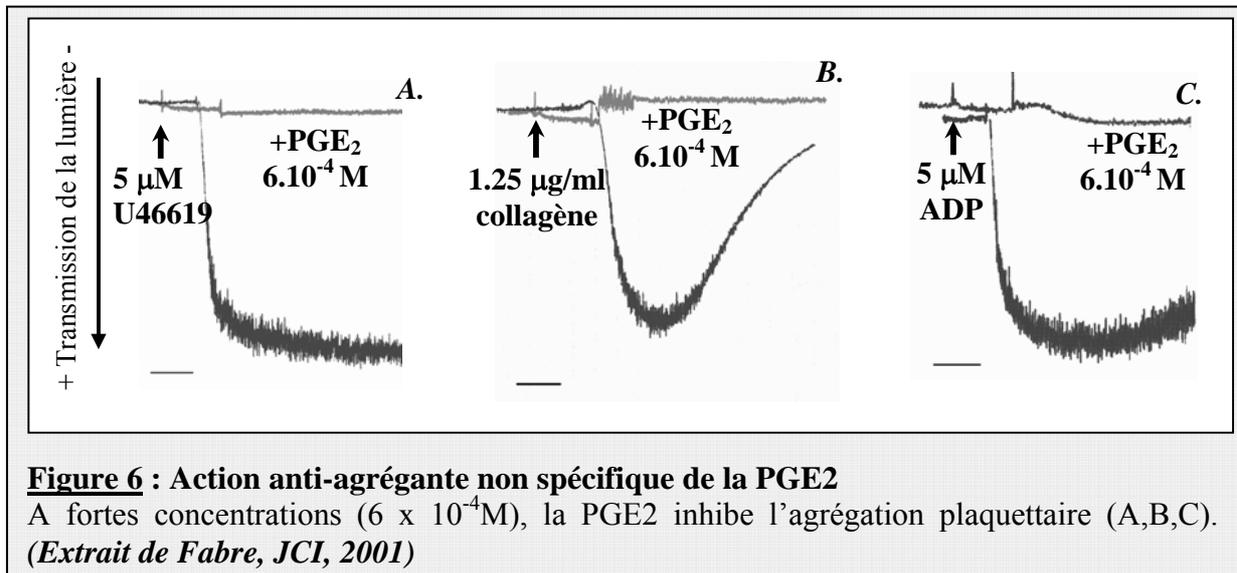
V. La PGE2 et les plaquettes : une action biphasique

Dans des conditions normales, les plaquettes n'interagissent pas entre elles. Par contre, en présence d'agonistes classiques tels que le TXA2, le collagène ou l'ADP, elles sont activées et changent de forme. Les plaquettes activées se lient pour former un réseau : c'est ce que l'on appelle l'agrégation plaquettaire. En pratique, l'utilisation d'un agrégomètre permet la détection *in vitro* d'une agrégation de plaquettes après les avoir mis en présence de leurs agonistes.

1. La PGE2 et son action inhibitrice sur l'agrégation plaquettaire

Ajoutée à de fortes concentrations (10^{-5} M) à une suspension de plaquettes *ex vivo* (test d'agrégométrie), la PGE2 inhibe l'agrégation plaquettaire^{79,80,46}. Par exemple, l'adjonction de U46619, un analogue du TXA2, entraîne une agrégation maximale (**Figure 6**, panel A, tracé

épais). L'expérience faite dans les mêmes conditions mais en présence de PGE2 à fortes concentrations montre une absence de réponse (**Figure 6**, panel A, tracé fin du haut).



En fait, cette action inhibitrice de la PGE2 n'est pas spécifique mais est due à l'activation du récepteur IP de la PGI2^{81,82,83,84}.

L'action spécifique de la PGE2 a alors été étudiée.

2. La PGE2 et son action facilitatrice sur l'agrégation plaquettaire

La PGE2 n'est pas un agoniste de l'agrégation plaquettaire. En effet, elle n'est pas capable à elle seule d'entraîner l'agrégation^{81,85,84}, c'est à dire que la PGE2 ajoutée à la suspension de plaquettes *ex vivo* sans agoniste les laisse indifférentes. Des plaquettes stimulées par de faibles concentrations d'agonistes comme du U46619, du collagène ou de l'ADP n'agrègent que de façon limitée. Par contre, si les plaquettes sont en présence de PGE2, la réponse est considérablement amplifiée^{86,87,84} (**Figure 7**). Cet effet facilitateur de l'agrégation plaquettaire ne se produit que pour les faibles concentrations de PGE2 (de 10^{-6}M à 10^{-8}M).

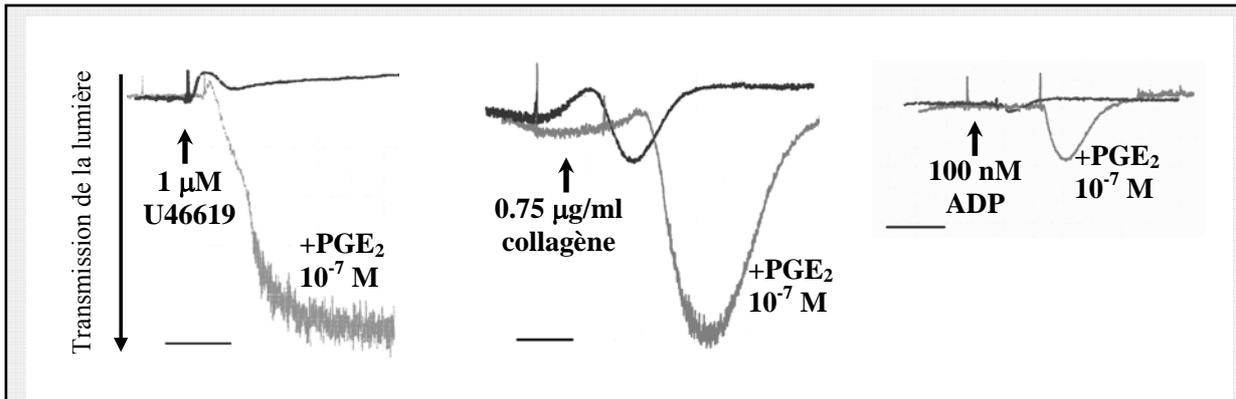


Figure 7 : La PGE₂ amplifie l'agrégation plaquettaire induite par de faibles concentrations d'agonistes

Des plaquettes de souris sauvages sont exposées à de faibles concentrations d'agonistes U46619 (1µM), collagène (0,75µg/mL) ou d'ADP (100nM) en présence ou non de PGE₂ (10⁻⁷M). (Extrait de Fabre, JCI, 2001)

L'effet facilitateur de la PGE₂ sur l'agrégation plaquettaire impose la présence d'au moins l'un de ses récepteurs sur les plaquettes. Effectivement, des études *in vitro* ont détectées la présence d'ARNm codant pour les récepteurs EP3 et EP4 dans les plaquettes humaines⁸⁸ ou murines⁸⁹. L'on peut noter que le récepteur EP3 y est prépondérant par rapport aux récepteurs EP4 et EP2 (**Figure 8**).

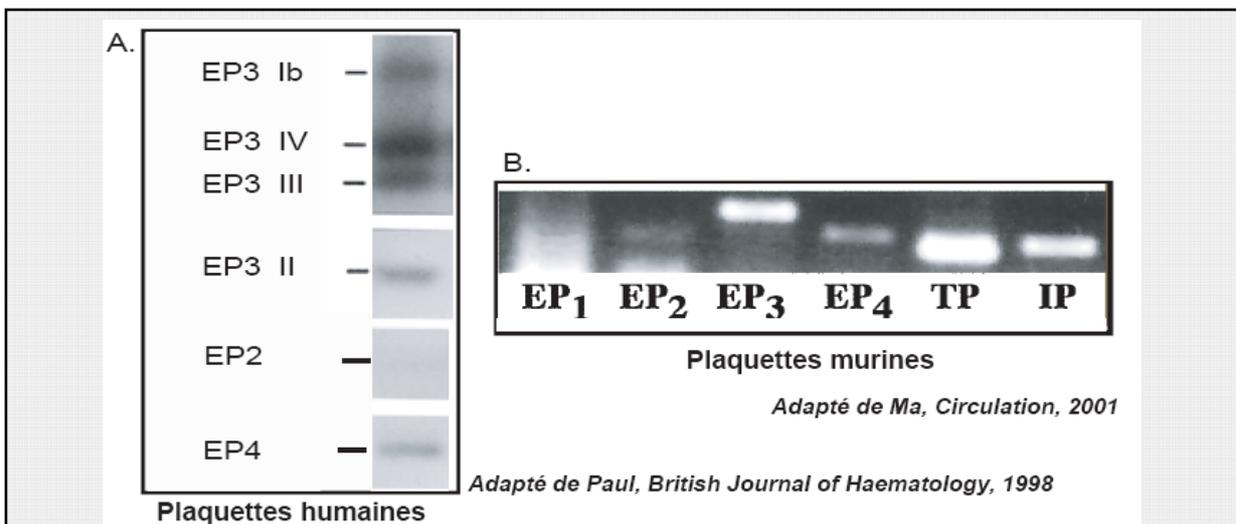


Figure 8 : Expression plaquettaire (RT-PCR) de quelques récepteurs prostanoidiens

Les plaquettes expriment de façon prépondérante les isoformes du récepteur EP3 par rapport aux récepteurs EP2 et EP4 chez l'homme (A) et la souris (B). La bande EP1 n'est pas spécifique. On peut noter la présence des récepteurs IP pour la PGI₂ et TP pour le récepteur du TXA₂ sur les plaquettes murines (B).

L'identification du récepteur mis en jeu dans l'action facilitatrice de la PGE2 a été effectuée grâce à l'utilisation de plaquettes provenant de souris invalidées pour chacun de gènes *Ep*.

En présence de faibles concentrations de PGE2 (10^{-7} M), la stimulation de plaquettes de souris *Ep3*^{+/+} amplifie la réponse plaquettaire obtenue après la seule activation des plaquettes par de faibles concentrations d'agonistes (**Figure 9A**). Mais l'absence du récepteur plaquettaire EP3 abolit l'effet facilitateur de l'agrégation⁸⁴ (**Figure 9A**). A l'inverse, dans les mêmes conditions, la perte des récepteurs EP1, EP2 ou EP4 sur les plaquettes ne modifie pas l'agrégation plaquettaire obtenu avec des plaquettes de souris non déficientes⁸⁴ (**Figure 9 B, C et D**).

Ainsi, l'action facilitatrice de la PGE2 au niveau de l'agrégation plaquettaire est spécifique du seul récepteur EP3.

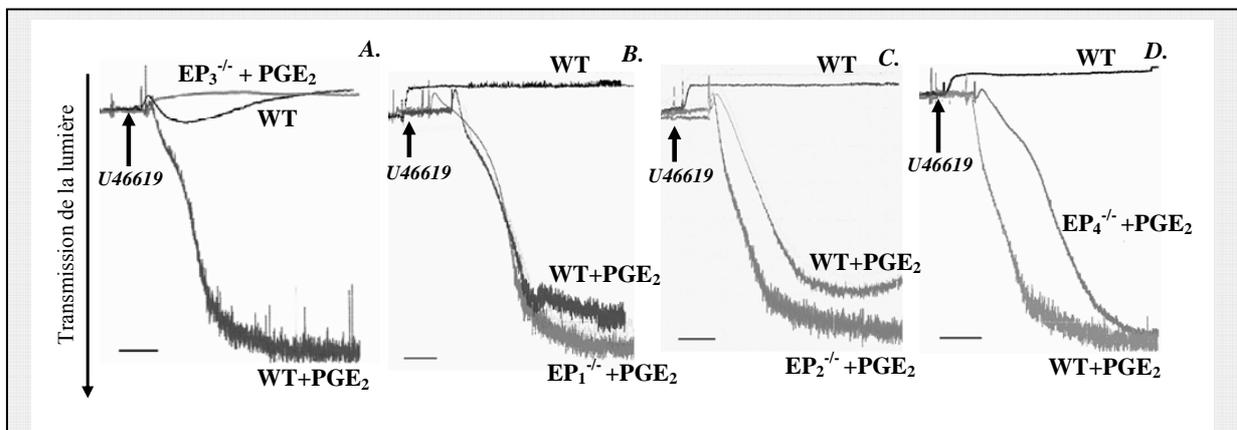
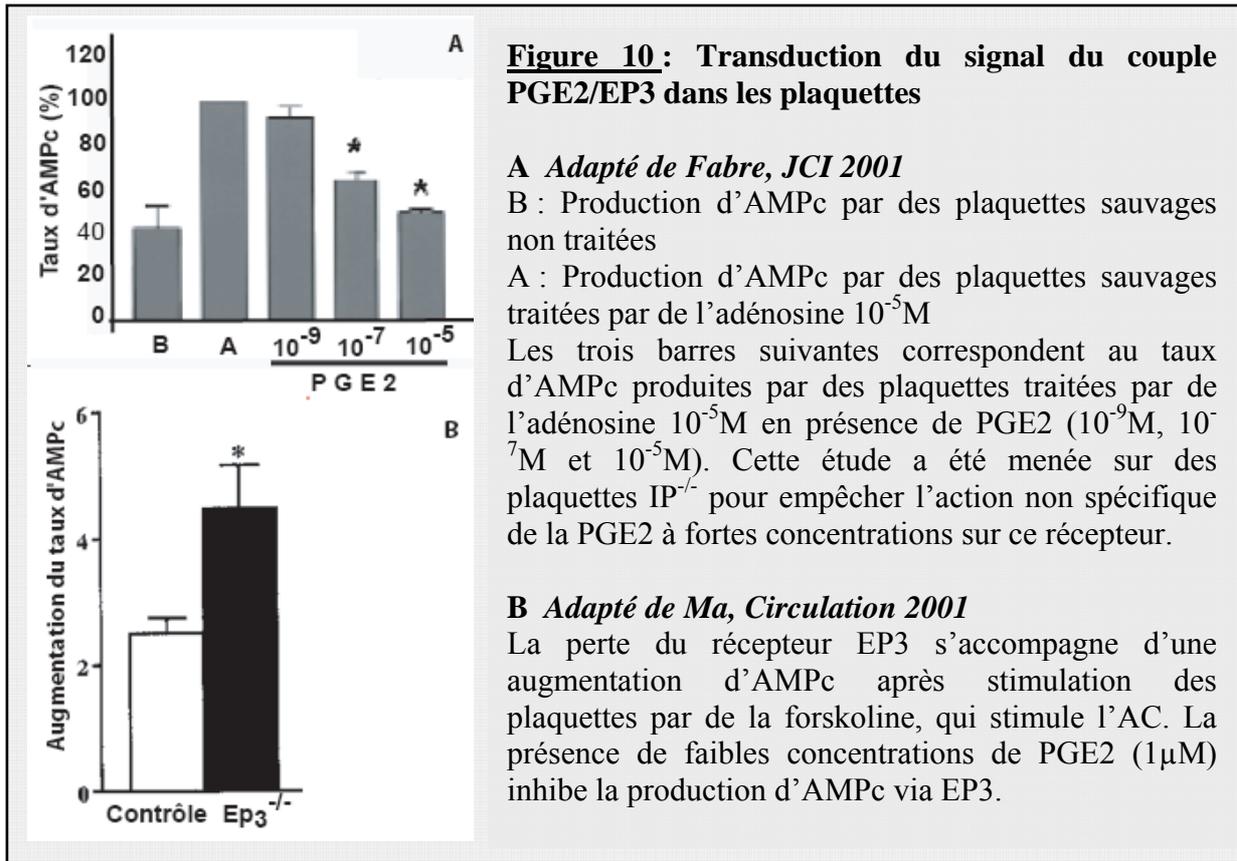


Figure 9 : La PGE2 potentialise l'agrégation plaquettaire via EP3

L'activation des plaquettes en réponse à un agoniste de l'agrégation plaquettaire (U46619 1μ M) et de faibles concentrations de PGE2 (10^{-7} M) entraîne la facilitation de l'agrégation plaquettaire médiée par la PGE2 via son récepteur EP3 (A) et non les autres récepteurs EP1, EP2 ou EP4 (B). (*Extrait de Fabre, JCI, 2001*)

Le récepteur EP3 peut se coupler à une protéine Gs ou Gi. Sachant que le taux d'AMPc diminue inversement à la concentration de PGE2 en présence mais pas en l'absence de EP3^{84,89,90} (**Figure 10 A et B**), il est clair que EP3 inhibe l'AC.

Il en a alors été déduit que le récepteur EP3 plaquettaire est couplé à une protéine G inhibitrice de type Gi pour inhiber l'AC. Mais, à l'heure actuelle, aucune étude n'a démontré la validité de cette assertion.

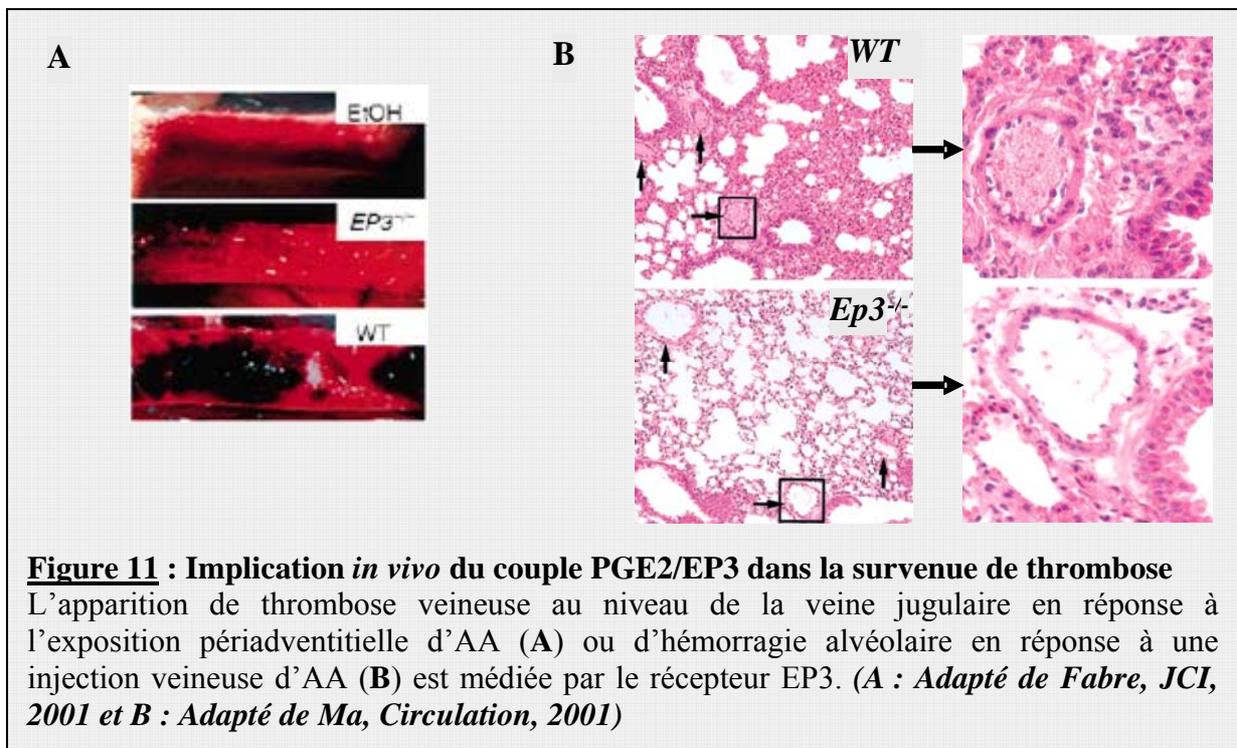


Le taux intracellulaire d'AMPc affecte la fonction plaquettaire en interférant avec trois mécanismes cellulaires. L'AMPc inhibe le couplage de l'agoniste plaquettaire à son récepteur⁹¹, inhibe la production d'IP3 consécutive à l'activation du récepteur⁹² et donc la mobilisation des stocks intracellulaires de Ca^{2+} ^{93,94} et aussi inhibe l'externalisation de la glycoprotéine $\alpha_{IIb}\beta_3$, récepteur du fibrinogène indispensable à l'agrégation plaquettaire⁹⁵. Donc, l'AMPc inhibe la réponse de la plaquette à son agoniste, la rendant incapable d'agréger. Ainsi, toute diminution d'AMPc favorise l'agrégation plaquettaire induite par les agonistes. Et donc, l'activation de EP3 qui diminue l'AMPc intra-plaquettaire sensibilise la plaquette à ses agonistes.

3. Etude de l'action de la PGE2 *in vivo* ?

Bien que la PGE2 possède une action biphasique *ex vivo*, la littérature n'a retenu que son seul effet inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire, souvent implicitement lié à un effet vasodilatateur comme pour la PGI2. L'effet de la PGE2 sur le comportement plaquettaire n'a jamais été étudié en physiologie. Pourtant des données *ex vivo* suggèrent une action pro-

thrombotique au niveau artériolaire⁹⁶. De plus, l'administration exogène veineuse d'AA suggère que la PGE2 peut faciliter la thrombose veineuse via son récepteur EP3^{84,89}. En effet, si l'exposition de la veine jugulaire de souris sauvages à de l'AA exogène provoque la formation d'une thrombose veineuse, cette même stimulation chez des souris *Ep3*^{-/-} n'entraîne qu'une thrombose significativement réduite⁸⁴ (**Figure 11A**) démontrant le rôle promoteur du récepteur EP3 dans l'apparition de caillots veineux. De plus, l'injection intraveineuse d'AA à des souris *Ep3*^{-/-} diminue leur mortalité par rapport à des souris sauvages et s'accompagne d'une diminution évidente des thromboembolies pulmonaires chez les souris *Ep3*^{-/-} (**Figure 11B**)⁹⁷.



Ces études montrent que la formation de thromboses veineuses est modulée par l'activation du récepteur EP3. Puisque cette activation du récepteur EP3 fait suite à l'apport exogène d'AA, probablement à dose supra-physiologique, il est raisonnable d'en déduire que cette action sur la thrombose est due à la PGE2. Cela signifie que l'effet facilitateur de la PGE2 prédomine *in vivo*, et non pas l'effet inhibiteur.

Par contre, le fait que la synthèse de PGE2 ait été provoquée par une administration directe de son précurseur est une limitation dans l'interprétation, qui ne nous permet pas de conclure quant au rôle facilitateur de la PGE2 dans la thrombose en physiopathologie.

L'apport exogène d'AA imite l'inflammation aigue. Puisque toute inflammation s'accompagne à priori d'une synthèse de PGE2⁸, il est logique de penser que la PGE2 puisse agir sur la thrombose *in vivo*. Ceci permettrait en partie d'améliorer la compréhension de la survenue de thromboses dans des certaines maladies inflammatoires vasculaires^{98,99}. Mais pour cela, il faut tout d'abord montrer que la PGE2 peut avoir un rôle dans le flux artériel et de plus, que le récepteur EP3 soit activé par la seule PGE2.

Mon travail de thèse a principalement consisté à tester le rôle de la PGE2 en physiologie et en pathologie. L'utilisation des souris déficientes pour le gène EP3^{100,84} m'a permis d'examiner si la PGE2 joue un rôle dans la balance homéostasique artérielle et si l'implication du couple PGE2/EP3 influence la thrombogénicité des plaques d'athérosclérose. En effet, la co-localisation de la COX-2 et de la PGES inductibles dans les plaques d'athérosclérose fait prédire que les plaques produisent de la PGE2, qui pourrait jouer un rôle dans l'athéromatose lors de la rupture de la plaque.

PARTIE I

Rôle de la PGE2 dans l'homéostasie artérielle

INTRODUCTION

I. L'homéostasie artérielle

1. Définition de l'homéostasie

« L'homéostasie est l'équilibre dynamique qui nous maintient en vie », Claude Bernard.

L'homéostasie est ainsi définie comme étant la capacité d'autorégulation de nos organes à faire face aux contraintes extérieures imposées par l'environnement.

Pour notre propos, l'homéostasie artérielle est donc l'équilibre entre tous les mécanismes hémodynamiques qui maintiennent la capacité de l'artère à assurer un débit tissulaire adapté. Cet équilibre est assuré par deux systèmes : le système de contrôle du tonus vasculaire et le système prévenant la formation de tout obstacle à l'écoulement sanguin.

2. Composantes de l'homéostasie artérielle

L'endothélium, de par sa position stratégique au sein de la paroi artérielle entre le sang circulant et les CMLV de la média, joue un rôle crucial dans l'adaptation du tonus vasculaire aux conditions hémodynamiques du flux sanguin. A part les modifications de taille de la paroi artérielle, dépendantes du flux sanguin, la lumière vasculaire est maintenue libre grâce au contrôle par la balance hémostatique entre les substances synthétisées par l'endothélium, d'une part et par les plaquettes, d'autre part.

a. Le tonus vasculaire

Le maintien du calibre artériel est sous la dépendance du tonus vasculaire, régulé par le système hormonal, le système nerveux autonome ou les conditions physiques locales. D'une part, le système hormonal agit sur la cellule endothéliale pour moduler l'état de contraction/relaxation des CMLV de la paroi artérielle. D'autre part, le baro-réflexe, sensible aux fluctuations périphériques de la pression artérielle régule cette pression en produisant des neuromédiateurs qui agissent sur les CMLV. Et enfin, les forces de cisaillement dépendant des conditions locales libèrent des molécules vasodilatatrices, notamment le monoxyde

d'azote (NO) et la PGI2 par les cellules endothéliales. Ces molécules relaxent les CMLV^{101,102} et ainsi augmentent le diamètre artériel.

b. La balance hémostatique

Le maintien de la liberté de l'écoulement sanguin impose que le système homéostatique prévienne toute thrombose intra-vasculaire indésirable. Le paradigme couramment accepté par la littérature est que le système thrombotique est sous le contrôle d'une balance hémostatique régulée d'une part par l'endothélium, et d'autre part par les plaquettes. En effet, l'endothélium synthétise en permanence du NO et de la PGI2 sous l'effet des forces de cisaillement, constituant ainsi une barrière protectrice et anti-thrombotique. En revanche, les plaquettes produisent du TXA2, puissant agoniste de l'agrégation plaquettaire. Le moindre déséquilibre de cette balance, engendré par des contraintes hémodynamiques inhabituelles ou un dysfonctionnement endothélial peut précipiter la formation d'un thrombus, perturbant l'écoulement du sang.

Dans le présent travail, je me suis intéressée uniquement à l'homéostasie de la balance hémostatique, en ignorant la régulation du tonus artériel.

Si dans les conditions physiologiques, l'équilibre hémostatique est sous la dépendance de deux prostaglandines, la PGI2 et le TXA2¹⁰³, certains travaux suggèrent la possibilité de l'implication d'une troisième prostaglandine, la PGE2^{84,89}.

II. L'hémostase physiologique.

1. L'endothélium vasculaire

a. Description de l'endothélium

L'endothélium, constitué d'une monocouche de cellules endothéliales tapisse la structure interne de l'artère. Son rôle est de limiter l'activation plaquettaire par la libération de médiateurs anti-thrombotiques, principalement le NO et la PGI2 sous le contrôle direct des forces de cisaillement.

b. Le monoxyde d'azote : NO

En réponse à l'acétylcholine, l'endothélium intact libère une substance vasodilatatrice, l'EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*)¹⁰⁴, qui s'est révélé être le NO^{105,106}. L'enzyme eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) produit le NO à partir de la L-Arginine et d'oxygène¹⁰⁷, est dépendante de la calmoduline et du calcium intracellulaire¹⁰⁸, et est exprimée de façon constitutive dans l'endothélium. Cette production de NO¹⁰⁹ est sous la dépendance des forces de cisaillement exercées par le flux sanguin sur les cellules endothéliales¹¹⁰. Le NO est un radical libre qui grâce à ses propriétés lipophiles est capable de franchir aisément les membranes cellulaires pour agir localement. Entre autres, le NO inhibe l'agrégation plaquettaire^{111,112} et la thrombose^{113,114} en activant la guanylate cyclase plaquettaire qui augmente le GMPc intra-cellulaire et réduit la mobilisation du calcium intracellulaire. De plus, le NO inhibe aussi l'adhésion des plaquettes et des leucocytes à la surface de l'endothélium^{115,116}. Enfin, le NO inhibe irréversiblement et de façon dose dépendante l'activité de la TXA2 synthase, l'enzyme terminale de synthèse du TXA2¹¹⁷. Ainsi, la production endothéliale de NO inhibe la thrombose intra-vasculaire.

c. La prostacycline : PGI2

D'abord nommée substance X¹⁰², la PGI2 est rapidement identifiée comme un métabolite de la voie de l'AA^{118,119}. Elle est produite par les cellules endothéliales^{119,120}, sous l'action des COXs¹²¹. De par sa nature constitutive, la COX-1 semble être l'enzyme de synthèse de la PGI2^{122,123}. Mais la détection endothéliale de l'isoforme COX-2¹²⁴, stimulée par les forces de cisaillement¹²⁵, et la diminution urinaire du 6-ketoPGF1 α , métabolite de la PGI2, par un inhibiteur de la COX-2¹²⁶ suggèrent que la COX-2 est la source majeure de PGI2 dans les cellules endothéliales. La PGI2, composé très instable, agit à proximité de son site de production en activant son récepteur IP¹²⁷. L'activation de IP par la PGI2 déclenche des voies de signalisation spécifiques d'un tissu donné¹²⁸. Au niveau des plaquettes et des cellules endothéliales, le récepteur IP est couplé à la protéine Gs qui stimule l'AC¹²⁹ et ainsi augmente la concentration intracellulaire d'AMPc¹³⁰. L'AMPc inhibe l'agrégation plaquettaire^{102,131}. A l'inverse, l'inhibition pharmacologique de l'activité de la PGI2 favorise l'adhérence temporaire des plaquettes aux cellules endothéliales^{132,133,121} et l'absence du récepteur IP augmente considérablement l'étendue de la thrombose^{134,84}. La production de PGI2 par l'endothélium a donc un rôle crucial dans l'équilibre hémostatique intra-vasculaire.

En conclusion, les cellules endothéliales sécrètent du NO et de la PGI₂, dont les actions permettent le maintien de l'homéostasie intra-artérielle en inhibant l'agrégation plaquettaire dans les conditions physiologiques. Ces deux systèmes sont redondants puisque la perte de fonction du NO est compensée par une augmentation de la sécrétion de PGI₂¹³⁵.

2. Les plaquettes

a. Description de la plaquette

La plaquette (ou thrombocyte) est une cellule anucléée, issue de la fragmentation des mégacaryocytes^{136,137} dans la moëlle osseuse. Les plaquettes ne vivent que brièvement et sont spécialisées dans la formation du thrombus. La thrombose résulte de l'activation de la plaquette par des agonistes spécifiques, comme l'ADP, le TXA₂, le collagène, et surtout la thrombine qui est produite activement par la voie de la coagulation. Lorsqu'elle est activée par l'un de ses agonistes, la plaquette change de forme, et émet de longues extensions pseudopodiales qui lui permettent d'établir des contacts avec les autres plaquettes via les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ qui fixent des molécules de fibrine en pont entre deux plaquettes. Ainsi, ces ponts forment un maillage qui capte les éléments figurés du sang, formant un début de thrombus. Par ailleurs, les plaquettes activées peuvent recruter des plaquettes non activées en sécrétant leurs granules α ou denses, qui contiennent de l'ADP et du TXA₂. Ainsi, le thrombus naissant grandit, parfois jusqu'à obstruer la lumière vasculaire.

b. Le thromboxane A₂ : TXA₂

La fin des années 60s se caractérise par la découverte d'une substance instable, appelée RCS, libérée après agrégation plaquettaire et dont une des propriétés est de contracter le muscle aortique^{138,139}. La substance RCS a été nommée thromboxane A₂ (TXA₂) et a été identifiée comme étant un métabolite de la voie de l'AA¹⁴⁰. Le TXA₂ a une durée de vie très brève et est dégradé en un composé biologiquement inactif, le 2,3 dinor-TXB₂. Dès sa synthèse, le TXA₂ agit sur son récepteur TP¹⁴¹, dont il existe plusieurs isoformes issues d'un épissage alternatif et spécifique du tissu. Dans la plaquette, l'activation de TP mobilise une protéine G_q, qui active la PLC et entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium¹⁴². Cette augmentation de calcium intra-cellulaire aboutit à une auto-amplification de sa synthèse, perpétuant son action. La perte de fonction du récepteur TP, qu'elle soit

pharmacologique^{143,144} ou génétique¹⁴⁵, montre que le TXA2 est à lui seul un puissant agoniste de l'agrégation plaquettaire.

Par ailleurs, le TXA2 possède des actions de constriction vasculaire et bronchique mais participe aussi à la prolifération des CMLV.

Dans les conditions physiologiques, les plaquettes synthétisent de façon constitutive du TXA2, puissant agent pro-agrégant¹⁴⁶, et sous la dépendance de la COX-1, seule COX exprimée par les plaquettes.

3. Le modèle actuel : Une balance entre agents anti et pro-agrégants

Les forces de cisaillement stimulent en permanence les plaquettes circulantes et les cellules endothéliales. En réponse à ces forces de cisaillement, d'une part les plaquettes synthétisent du TXA2¹⁴⁶, susceptible d'activer les plaquettes et d'engendrer une agrégation, et d'autre part les cellules endothéliales produisent de la PGI2 et du NO, substances anti-agrégantes. Ces deux dernières molécules élèvent le seuil d'activation de la plaquette, c'est à dire rendent la plaquette plus difficile à activer. Ainsi, le résultat final, le déclenchement ou non d'une agrégation plaquettaire et la constitution d'un thrombus, dépendront de l'équilibre entre action pro-agrégante du TXA2 et action inhibitrice de PGI2 et/ou du NO. Dans les conditions physiologiques, la balance est en faveur de la PGI2 et du NO, et prévient donc l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sur l'endothélium.

III. Influence de l'inflammation vasculaire sur l'hémostase artérielle.

La réaction de l'organisme à une agression physique, chimique, bactérienne, virale ou autre est de développer une réaction inflammatoire locale. Au niveau vasculaire, la réaction inflammatoire perturbe l'équilibre hémostatique, et conduit alors le vaisseau vers un état pro-thrombotique. Une thrombose peut survenir dans deux conditions : au niveau d'un endothélium non lésé mais activé par un état inflammatoire ou au niveau d'une brèche endothéliale qui en exposant le contenu sous-endothélial augmente localement l'inflammation et le potentiel pro-thrombogène. La « finalité » de cette seconde thrombose est la réparation de la lésion endothéliale et a donc un rôle bénéfique pour la paroi vasculaire. Mais la survenue

d'une thrombose peut avoir des conséquences locales néfastes, principalement en provoquant une ischémie prolongée des tissus perfusés.

1. Inflammation et thrombose

a. Influence de l'inflammation sur l'endothélium qui devient pro-agrégant

L'inflammation de la paroi vasculaire provoque d'importantes dérégulations endothéliales qui entraînent la diminution de sa fonction anti-agrégante et par conséquent, un renforcement de son caractère pro-adhésif des éléments figurés du sang, notamment des plaquettes.

i. Influence de l'inflammation sur le NO

L'état inflammatoire stimule l'expression de la NOS inductible (iNOS)¹⁰⁹ engendrant une synthèse abondante de NO par l'endothélium¹⁴⁷, mais aussi les NADPH oxydases¹⁴⁸, sources majeures de superoxyde O_2^- . La présence conjointe de NO et de O_2^- dans les cellules endothéliales provoque alors la formation de radicaux libres, les ROS, qui modifient les cofacteurs de la eNOS^{149,150}. Cette modification des cofacteurs de la eNOS diminue son efficacité et réoriente son activité vers la production d'ions superoxyde¹⁵¹. La production de ROS a de nombreux effets cellulaires¹⁵² et notamment de favoriser l'apoptose. Les ROS augmentent également l'expression de molécules d'adhésion et de chemokines¹⁵³ par l'endothélium comme la V-CAM1^{154,155} ou le MCP-1¹⁵⁶ en modulant l'activité de la voie du NFkB¹⁵⁷.

De plus, les conséquences de cette diminution de NO ont été étudiées chez des souris invalidées pour eNOS. Malheureusement, ces études ne donnent pas une vision claire, si ce n'est que le NO influence de façons diverses la balance hémostatique. En effet, l'absence de la eNOS augmente ou diminue le temps d'occlusion des artères après induction d'une thrombose selon les publications^{158,159}. Au niveau moléculaire, l'absence du NO entraîne une augmentation du relargage des granules de Weibel Palade, et donc augmente la capacité de fibrinolyse locale, la libération de la P-Sélectine, et de vWF^{158,160}. D'autre part, l'absence de NO rend les plaquettes plus réactives¹⁶¹. Ainsi, l'absence de NO semble avoir des conséquences contradictoires sur la thrombogénicité, mais surtout je note que ces études n'ont pas pris en compte la possibilité d'une surexpression de la voie de la prostacycline chez ces

souris génétiquement modifiées^{135,162}. Il est donc difficile de tirer des conclusions définitives sur le rôle du NO dans la thrombogénicité actuellement. L'élément le plus sûr est que la réactivité plaquettaire est clairement inhibée par la voie du NO.

En conclusion, l'inflammation diminue la quantité produite de NO, et augmente la production de ROS¹⁶³. La conséquence en est une augmentation de l'adhésivité de l'endothélium et une augmentation de la réactivité plaquettaire.

ii. Influence de l'inflammation sur la PGI2

Les études *in vitro* montrent que la PGI2 est discrètement augmentée en réponse à une inflammation aiguë^{8,164}, mais aussi chronique^{165,166}. La PGI2 est une prostaglandine très instable dont la détection est délicate ; une des techniques couramment utilisée est la détection urinaire de son métabolite stable, la 6-keto PGF1 α par chromatographie GC/MS mais cette méthode n'est pas spécifique d'un tissu et donc de l'origine de la PGI2¹⁶⁷. Théoriquement, la diminution de production de NO induite par l'inflammation pourrait être compensée par une augmentation de la synthèse de PGI2^{135,162}. Cependant, s'il a été montré que des patients atteints d'inflammation chronique ont une élévation de la 6-keto PGF1 α ¹⁶⁸, nous n'avons pas encore de données nous permettant d'affirmer que la production endothéliale de PGI2 est augmentée par l'inflammation *in vivo*.

iii. Autres influences de l'inflammation sur l'endothélium.

Le stress inflammatoire augmente le potentiel pro-agrégant des cellules endothéliales par d'autres mécanismes que par la voie du NO. Par exemples, l'inflammation induit la sur-expression de récepteurs transmembranaires, comme le récepteur du fibrinogène (intégrine $\alpha_v\beta_3$)¹⁶⁹, les molécules d'adhésion (CAMs) ou le récepteur du vWF (glycoprotéine GpIb α)¹⁷⁰. De plus, l'activation des cellules endothéliales libère le contenu des granules Weibel Palade, relarguant ainsi le vWF¹⁷¹ ou la P-Sélectine. L'inflammation stimule la production de FT^{172,173} et diminue la capacité de l'endothélium à exprimer le TFPI, l'inhibiteur du FT. La perte de fonction de la thrombomoduline¹⁷⁴, l'activation du facteur X de la coagulation¹⁷⁵ ainsi que la stimulation de l'activité de la prothrombinase contenue dans les membranes endothéliales¹⁷⁶ sont autant de facteurs qui activent la voie de la coagulation. Tous ces éléments montrent que l'inflammation endothéliale favorise la thrombose.

En conclusion, l'inflammation endothéliale diminue l'efficacité de la barrière protectrice anti-thrombotique.

b. Influence de l'inflammation sur les plaquettes

Les propriétés pro-adhésives développées par l'activation des cellules endothéliales favorisent l'adhésion des plaquettes. La plaquette est alors soumise à l'influence de l'inflammation tissulaire.

i. Effet de l'inflammation sur les capacités adhésives des plaquettes

La reconnaissance des P-sélectines endothéliales par les plaquettes entraîne leur liaison lâche à l'endothélium^{177,178}. Ces interactions ne sont pas stables et peuvent être rapidement réversibles. Donc des contacts additionnels sont nécessaires pour convertir ces attaches en ferme adhésion endothéliale. Dans ce contexte, il a été démontré que les intégrines β_3 jouent un rôle primordial mais il n'est pas encore bien établi comment ces interaction se font sans lésion endothéliale¹⁷⁹. En effet, l'adhésion plaquettaire peut se faire sur un endothélium intact ou lésé ; cette deuxième situation évoquée augmente l'adhésivité de l'endothélium¹⁸⁰ dans la mesure où du collagène fibrillaire est exposé et privilégie les interactions notamment par la glycoprotéine GpIb α ^{181,182}. De plus, les plaquettes interagissent avec la laminine, la fibronectine par les intégrines $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_{III}$. La multiplicité des interactions entre plaquettes et endothélium prolonge le temps de contact des plaquettes.

Quand la plaquette est activée, elle relargue ses granules et libère des molécules d'adhésion (le fibrinogène, le facteur vWF, la glycoprotéine $\alpha_{IIb}\beta_{III}$, la thrombospondine), des facteurs de croissance (PDGF, le TFG β), des chemokines (RANTES, le PAF-4), des cytokines (II-1 β), le ligand du CD40, ou encore des facteurs de coagulations (facteurs V et XI, le PAI-1, le plasminogène). La libération de toutes ces molécules amplifie encore les adhésions plaquettes-endothélium^{183,184} et augmente le degré d'inflammation tissulaire par la libération du ligand CD40 qui interagit avec le récepteur endothélial CD40 aboutissant à la stimulation de l'expression de chemokines, de molécules d'adhésion et de métalloprotéinases (MMPs). De plus, le ligand CD40 participe à la survenue et la stabilité de la thrombose par son interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ ¹⁸⁵.

En conclusion, l'inflammation prolonge le temps de contact plaquettes et tissu enflammé, favorisant l'activation des plaquettes qui une fois activées, participent à l'inflammation locale.

ii. Les agonistes alors en présence

Les plaquettes immobilisées soit par leur attachement à l'endothélium, soit par leur fixation directe à la zone lésée sont ainsi exposées aux agonistes relargués par la lésion et/ou les plaquettes déjà activées. Ainsi, la plaquette sera activée par le collagène exposé par la dénudation endothéliale, par l'ADP, libéré par les cellules apoptotiques ou sécrété par les plaquettes activées, par le TXA2 libéré par les plaquettes ou par l'inflammation locale, ou encore par la thrombine, résultant de l'activation de la voie de la coagulation. Tous ces agonistes plaquettaires agissent en synergie pour activer les plaquettes et initier une thrombose.

✓ La thrombine

L'inflammation favorise la production du FT^{172,173}, glycoprotéine transmembranaire qui forme avec le facteur VIIa un complexe permettant l'activation des facteurs de la voie de la coagulation (facteurs IX et X) et la génération de la thrombine. Donc, l'inflammation augmente la production de thrombine. La thrombine a deux rôles : comme enzyme sérine protéase, elle clive le fibrinogène pour générer de la fibrine qui consolide la thrombose. Son deuxième rôle est une action directe sur la plaquette.

La thrombine¹⁸⁶ active la plaquette en se fixant sur ses récepteurs PARs, PAR-1, PAR-3 et PAR-4. Ces récepteurs (*Protease Activated Receptor*) sont doués d'une activité protéolytique indispensable à leur activation¹⁸⁷. L'activation des PARs stimule différentes voies de signalisation intra-cellulaires en se couplant à diverses protéines G. Ces voies de signalisation thrombine/PAR constituent un mode d'activation majeure de la plaquette.

En bref, l'inflammation favorise la production de thrombine et ainsi augmente la thrombogénicité locale.

✓ Le TXA2

Toute inflammation s'accompagne du recrutement de macrophages. Ces macrophages soumis à un stress inflammatoire augmentent de façon considérable leur production de TXA2⁸, et ainsi pourrait augmenter la thrombogénicité locale. Cependant, la signification de ce résultat *in vitro* n'est pas claire *in vivo*.

Donc, l'inflammation augmente la production de TXA2 sans que la conséquence en soit démontrée *in vivo*.

✓ Le collagène

Les plaquettes adhèrent directement au collagène par l'intermédiaire de récepteurs plaquettaires spécifiques, $\alpha 2\beta 1$ et GpVI¹⁸⁸ qui est un membre de la superfamille des immunoglobulines. La fonctionnalité de la GpVI est primordiale pour l'adhésion des plaquettes à l'endothélium lésé, leur activation et leur agrégation sous-jacente via le collagène^{189,190}. La GpVI agit en coopération avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ ^{191,192}.

En bref, le collagène joue un rôle fondamental dans l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sur le site de la lésion, mais il n'y a pas de données montrant un effet de l'inflammation.

✓ L'ADP

L'ADP peut être libéré au niveau de la brèche endothéliale par la mort cellulaire mais aussi par les plaquettes relarguant ses granules denses.

L'ADP a deux récepteurs de la famille de récepteur à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, les récepteurs P2Y1 et P2Y12. Ces deux voies de signalisation sont complémentaires mais différentes. Le récepteur P2Y1 est couplé à une protéine Gq dont l'activation stimule la PLC, alors que le récepteur P2Y12 est couplé à une protéine Gi dont l'activation inhibe l'AC entraînant une diminution de la production d'AMPc et une mobilisation de calcium intra-cellulaire^{193;194}. L'ADP libéré par les plaquettes activées joue un rôle important dans l'amplification de la thrombose, sans lien décrit avec l'inflammation.

En bref, l'ADP comme le TXA2 amplifie la thrombose, mais à la différence de celui-ci n'est pas influencé par l'inflammation.

Conclusion : L'inflammation en augmentant le caractère pro-adhésif de l'endothélium prolonge le temps de contact des plaquettes à l'endothélium. Avec comme conséquence l'augmentation de la probabilité que la plaquette soit activée par un agoniste libéré dans la voisinage par la lésion. L'inflammation favorise la production de thrombine et de TXA2. Quand la plaquette adhère à l'endothélium, elle est préférentiellement activée par ces deux agonistes qui déclencheront son activation. Quand la plaquette adhère à la lésion, elle est par contre directement activée par le collagène et/ou l'ADP. Dans tous les cas, la plaquette activée libère ses granules et des médiateurs pro-adhésifs et pro-agrégants. Ces derniers mécanismes entretiennent et amplifient les processus pour aboutir à la thrombose intra-vasculaire.

2. *Maladies inflammatoires vasculaires*

En clinique, plusieurs cas de maladies inflammatoires vasculaires suggèrent l'existence d'une relation entre l'inflammation de la paroi vasculaire et la survenue de thrombose locale. Je prends ici deux exemples : la maladie de Buerger et la maladie de Crohn, mais il existe d'autres vascularites accompagnées de thrombose.

La maladie de Buerger ou la thromboangéite oblitérante⁹⁸ est une atteinte inflammatoire des artères et veines de petits et moyens calibres des extrémités, le plus souvent en relation avec un tabagisme important du sujet jeune. Cette maladie s'accompagne d'une thrombose occlusive locale entraînant une ischémie digitale des membres dont l'évolution ultime est la gangrène. L'administration exogène de PGI2 a été efficace dans la plupart des cas.

La maladie de Crohn, maladie inflammatoire du tube digestif est associée à une augmentation de l'incidence de complications thromboemboliques artérielles et veineuses. L'état pro-agrégant des patients atteints de ces maladies est augmenté^{195,196}. Certains patients atteints de la maladie de Crohn ont développé une thrombose artérielle mésentérique sans augmentation des facteurs de risque connus⁹⁹. Cela suggère donc qu'un état inflammatoire est capable d'induire la survenue d'une thrombose artérielle.

Toutes ces données montrent que l'inflammation de la paroi vasculaire s'accompagne de thrombose artérielle, ce qui renforce l'hypothèse d'un lien inflammation-thrombose.

IV. Hypothèses de travail

En synthèse, cette introduction de la première partie permet de comprendre que la balance hémostatique physiologique de base est un équilibre entre la réactivité des plaquettes et les propriétés anti-thrombotiques de l'endothélium. Cet équilibre est perturbé par l'inflammation de la paroi vasculaire qui engendre l'augmentation de la thrombogénicité locale. Cette hyperthrombogénicité locale résulte de la diminution de l'efficacité anti-thrombotique de l'endothélium, de l'augmentation de la réactivité plaquettaire et de la production locale de facteur tissulaire. La conséquence la plus importante pour les plaquettes est l'augmentation de leur temps de contact avec les tissus enflammés.

Par ailleurs, l'inflammation a pour conséquence l'activation de la voie de l'AA et donc la production de PGE2. Or l'on sait que cette PGE2 peut avoir un effet facilitateur de la thrombose *in vivo* en activant spécifiquement son récepteur EP3.

La question est alors de déterminer si la PGE2 joue un rôle dans l'hyper-thrombogénicité locale engendrée par l'inflammation tissulaire.

J'ai donc posé l'hypothèse que la PGE2 produite par la paroi vasculaire enflammée active son récepteur EP3 sur les plaquettes localement « immobilisées » par l'inflammation et ainsi sensibilise ces plaquettes aux agonistes présents dans l'environnement (**Figure I-1**).

Pour tester cette hypothèse, j'ai cherché à montrer que la paroi artérielle produit de la PGE2 sous l'effet de l'inflammation et j'ai employé plusieurs modèles pour tester l'effet de cette PGE2 sur la thrombose *in vivo*.

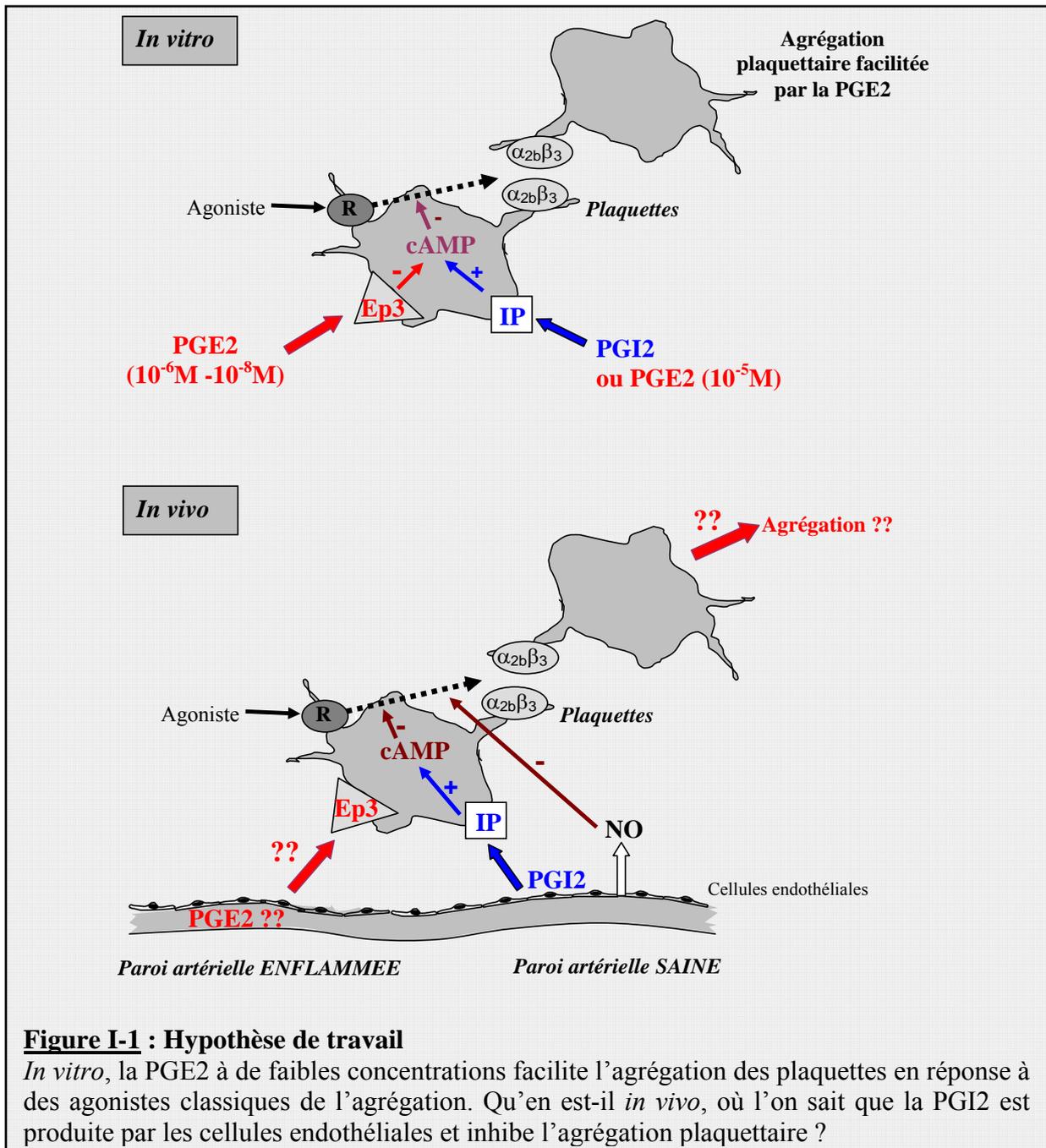


Figure I-1 : Hypothèse de travail

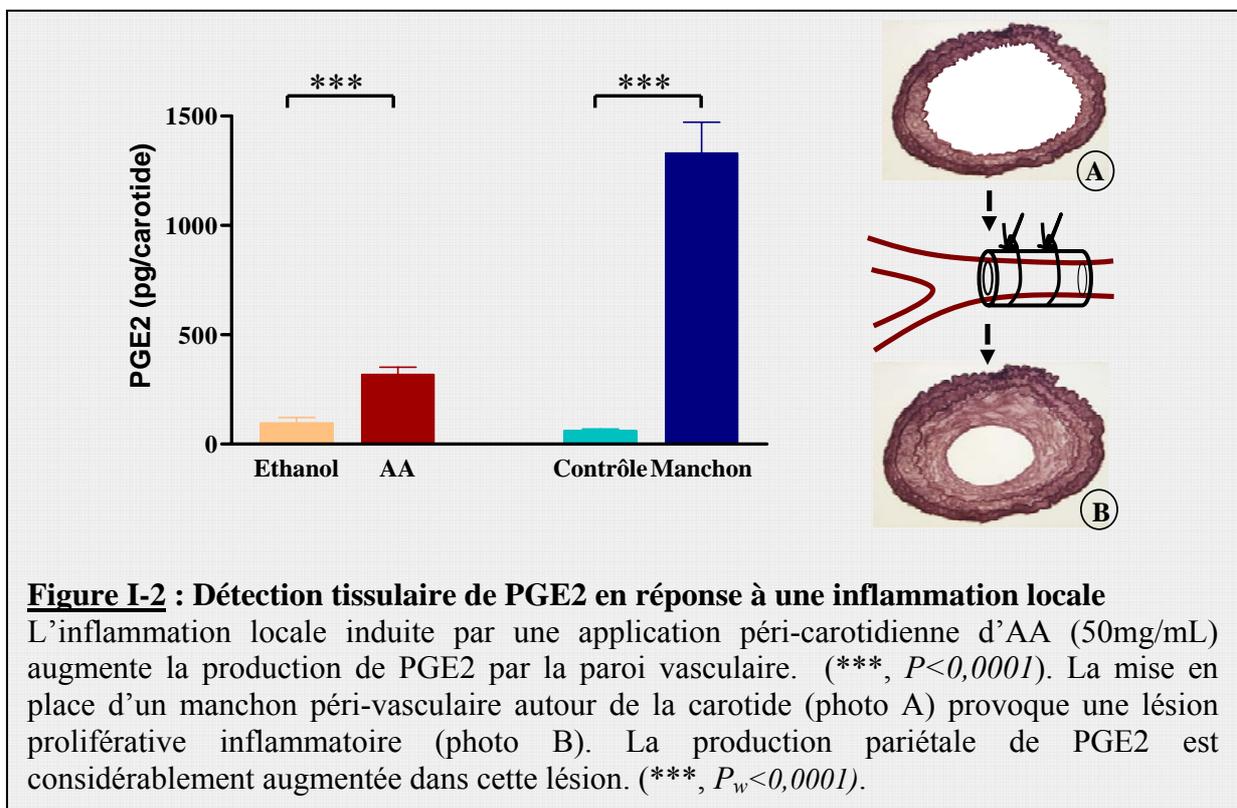
In vitro, la PGE2 à de faibles concentrations facilite l'agrégation des plaquettes en réponse à des agonistes classiques de l'agrégation. Qu'en est-il *in vivo*, où l'on sait que la PGI2 est produite par les cellules endothéliales et inhibe l'agrégation plaquettaire ?

RESULTATS

I. Production de PGE2 par la paroi artérielle

Pour déterminer le rôle de la PGE2 dans la thrombose artérielle *in vivo*, j'ai testé la capacité de la paroi artérielle à produire de la PGE2. Des études antérieures ont mis en évidence que les cellules endothéliales en culture peuvent effectivement produire de la PGE2 en réponse à une inflammation¹⁶⁵, mais je m'intéresse ici à l'ensemble de la paroi artérielle *in vivo*.

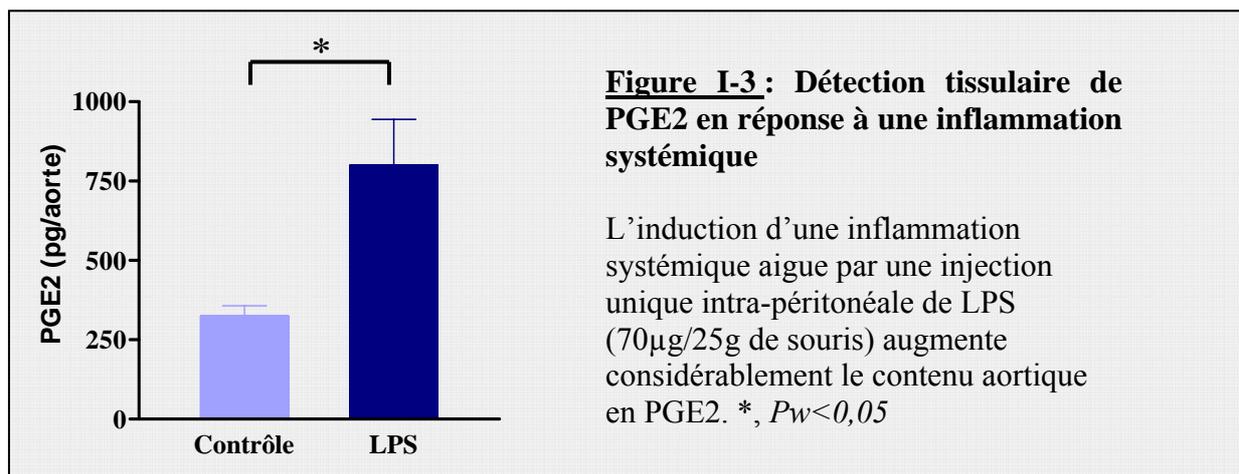
J'ai exposé la paroi artérielle, plus exactement sa tunique externe, l'adventice, à de l'AA (50mg/mL) qui est le précurseur de la PGE2. Si cette exposition augmente la quantité de PGE2 produite par la paroi, je pourrai en déduire qu'elle possède l'équipement enzymatique nécessaire à la transformation de l'AA en PGE2. Après avoir laissé à la paroi le temps de métaboliser l'AA (10 minutes), la carotide est prélevée et broyée, les lipides extraits et la PGE2 présente dans l'échantillon est quantifiée par la technique elisa. Le contenu carotidien en PGE2 a été augmenté en réponse à l'exposition péri-adventitielle d'AA (317±35 pg/carotide, n=13) par rapport au contenu de la carotide exposée seulement à l'éthanol (96±26 pg/carotide, n=16 $P<0.0001$), le solvant de l'AA (**Figure I-2**). Donc, la paroi artérielle contient l'équipement enzymatique nécessaire à la métabolisation de l'AA en PGE2.



L'application d'AA, bien qu'elle m'ait permis de tester la production pariétale de PGE2 ne mime pas une situation inflammatoire physiologique. Ce premier résultat a alors été vérifié en provoquant une inflammation dans un cadre plus proche de la physiopathologie.

Pour cela, un manchon de polyéthylène est placé autour d'une carotide saine et laissé pendant 4 semaines¹⁹⁷ (**Figure I-2-photoA**). Ce dispositif péri-adventitial entraîne une réaction inflammatoire et la constitution d'une lésion proliférative à l'origine d'une sténose luminale. Cette sténose ressemble à une lésion de type athérosclérotique (**Figure I-2-photoB**). La quantité pariétale de PGE2 a été significativement augmentée en réponse à la mise en place de ce manchon péri-adventitial par rapport à la paroi saine (1330 ± 141 pg/carotide, $n=16$ vs. 61 ± 8 pg/carotide, $n=6$, respectivement, $P_w < 0.0001$) (**Figure I-2**). Deux conclusions s'imposent : d'une part, les mécanismes inflammatoires produisent suffisamment d'AA pour augmenter la synthèse de PGE2, et d'autre part, la lésion inflammatoire chronique produit des quantités considérables de PGE2.

De plus, un deuxième cas d'inflammation a été testé : il s'agit d'une injection intra-péritonéale de LPS qui induit une inflammation systémique. Après 12h de traitement, l'ensemble de l'aorte de ces souris est prélevé de la crosse aortique à la bifurcation iliaque, et la PGE2 en a été quantifiée. Cette situation de stress inflammatoire a triplé la quantité aortique de PGE2 par rapport à l'aorte saine ($799,8 \pm 144,7$ pg/aorte, $n=10$, vs. $324,5 \pm 32,6$, $n=13$ pg/aorte $P < 0.05$) (**I-Figure3**).



En conclusion, le niveau basal de PGE2 trouvé dans la paroi artérielle saine est significativement augmenté en réponse à différentes stimulations inflammatoires, qu'elles soient aigüe et systémique ou chronique et locale. Donc l'inflammation de la paroi artérielle provoque la synthèse de la PGE2 par la paroi. Il s'agit maintenant de savoir dans quel but la

paroi artérielle augmente sa quantité de PGE2. Sachant que la PGE2 modifie le comportement plaquettaire *in vitro*, j'ai examiné si la PGE2 joue un rôle *in vivo* dans l'hémostase artérielle.

II. Modulation de la thrombose artérielle par l'activation du récepteur EP3 de la PGE2

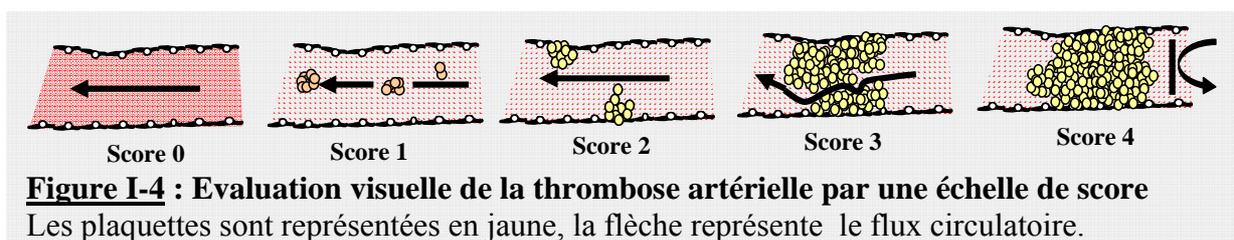
Pour tester le rôle de la PGE2 pariétale dans l'hémostase artérielle, il me fallait une méthode d'induction *in vivo* de thrombose inflammatoire. Deux méthodes d'induction de la thrombose artérielle ont été utilisées dans le but de déterminer si la PGE2 joue un rôle dans la survenue de la thrombose *in vivo*.

1. Le modèle de thrombose artérielle induite par AA

Le moyen le plus facile d'induire une thrombose et de tester directement le rôle de la PGE2 produite a été de forcer la carotide à produire de la PGE2 en l'exposant à de l'AA. Une étude antérieure avait déjà employé cette technique mais sur le lit veineux⁸⁴ et je l'ai donc adapté à l'artère carotidienne.

a. Caractérisation du modèle

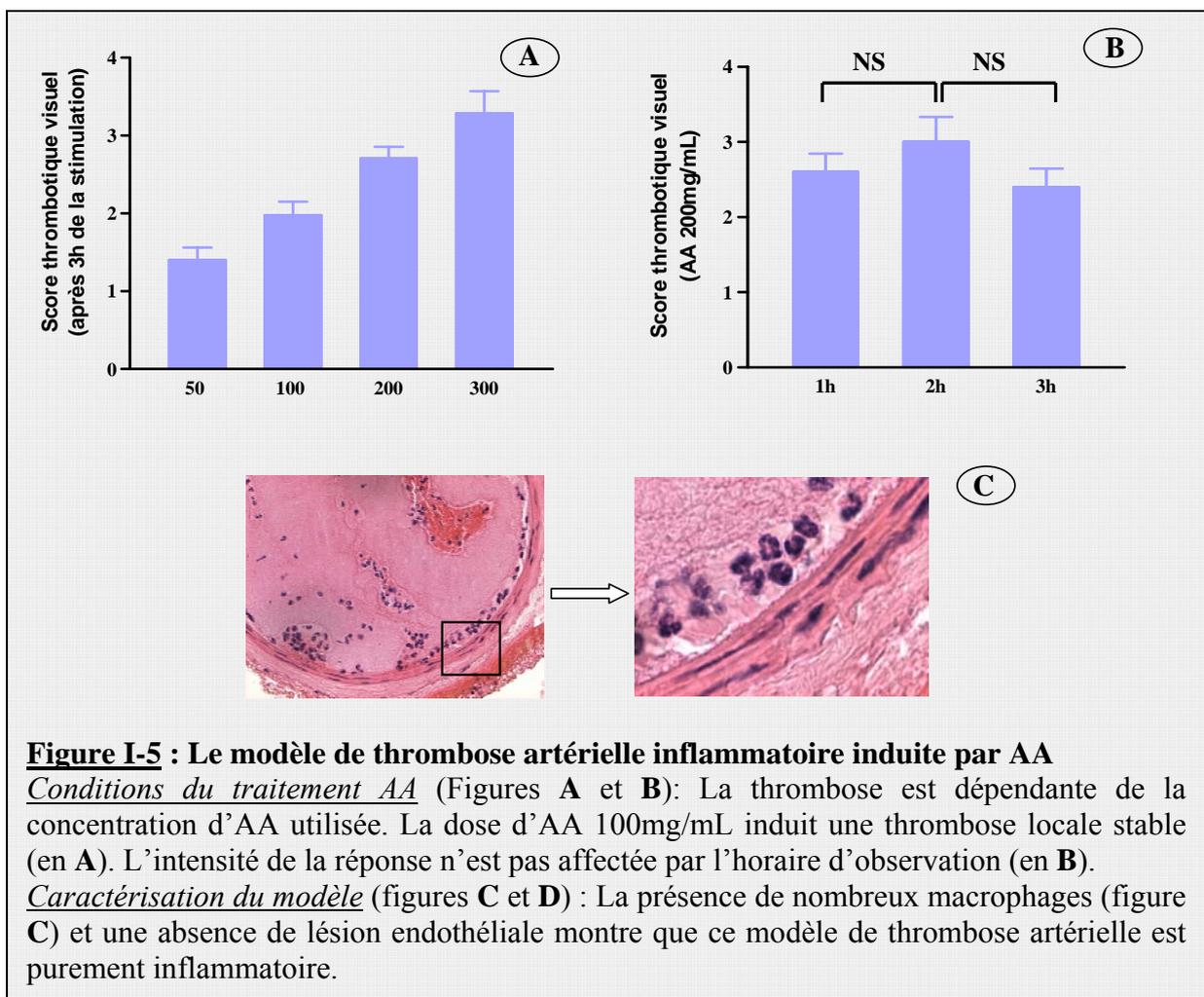
Après application péri-adventitielle d'AA sur la carotide, la thrombose a été observée visuellement au travers d'une loupe binoculaire et 'semi-quantifiée' grâce à une échelle de score thrombotique définie précédemment^{134,84}. L'échelle s'étend de 0 à 4 : le score 0 correspond à une absence totale de thrombose, le score de 1 à une petite thrombose instable c'est-à-dire labile, le score 2 à une thrombose moyenne stable c'est-à-dire fixée à la paroi, le score 3 à une thrombose massive mais non occlusive c'est-à-dire que l'artère n'est pas totalement obstruée par le caillot et enfin le score 4 correspond à une thrombose massive et occlusive (**Figure I-4**).



La thrombose est évaluée après un temps d'attente de 3 heures pendant lesquelles la souris traitée est suturée et replacée dans sa cage. L'adaptation de ce modèle de thrombose a nécessité quelques tests préliminaires.

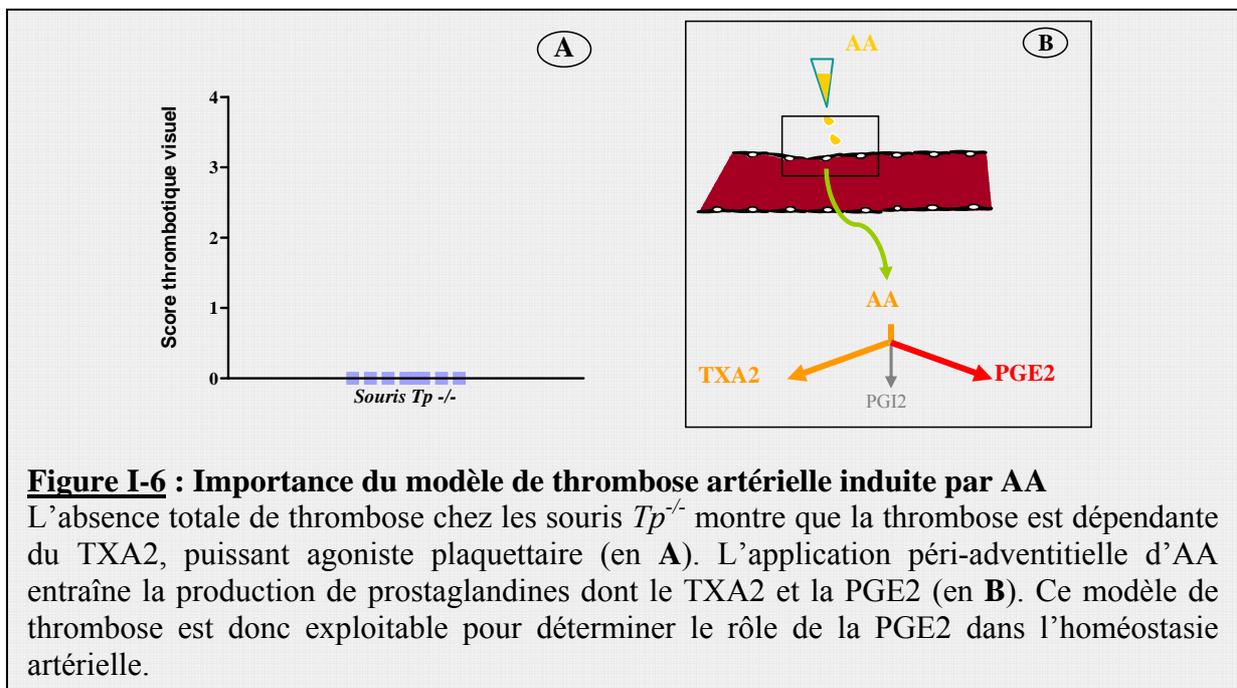
Tout d'abord, l'effet de l'AA sur l'obtention d'une thrombose artérielle a été évalué en testant différentes concentrations d'AA (de 50 à 300 mg/mL). La thrombose ainsi détectée est dépendante de la dose d'AA employée comme le montre le graphe de la **Figure I-5A**. Puis, j'ai observé l'évolution de la thrombose en fonction du temps d'observation au bout duquel la thrombose est évaluée pour une dose d'AA pré-définie (200mg/mL). L'évaluation de la thrombose après 1h, 2h ou 3h de la stimulation aboutit à un score thrombotique identique (**Figure I-5B**). Donc, ce temps d'observation n'influence guère l'étendue de la thrombose, du moins jusqu'à 3 heures.

J'ai retenu comme condition d'expérience la dose de 100mg/mL qui entraîne la formation d'une thrombose artérielle stable *in vivo* au bout de 2 heures de traitement (score moyen $1,97 \pm 0,17$, $n=43$).



Pour m'assurer que la thrombose dans ce modèle n'est pas simplement le résultat d'une lésion endothéliale due à la toxicité de l'AA, j'ai examiné des coupes histologiques du thrombus. Les coupes montrent la présence d'un grand nombre de macrophages au contact de la paroi artérielle, leur présence étant probablement due au stimulus inflammatoire, mais les cellules endothéliales sont intactes dans les conditions d'observation (microscopie optique). Ainsi, l'application péri-adventitielle d'AA provoque une thrombose qui est due à la conversion de l'AA en métabolites et non à la réponse d'une lésion endothéliale due à un effet toxique de l'AA, qui aurait exposé le collagène sous-endothélial et aurait libéré de l'ADP. Ce modèle d'induction de la thrombose artérielle est purement inflammatoire (**Figure I-5, photo C**).

Sachant que la PGE2 pré-active les plaquettes, c'est-à-dire les sensibilise à leurs agonistes sans activer l'agrégation, que la thrombose est purement inflammatoire, et que le seul agoniste plaquettaire produit par le métabolisme de l'AA est le TXA2, j'ai vérifié que mon modèle de thrombose est bien TXA2-dépendant. Pour cela, la thrombose artérielle a été induite dans des carotides de souris déficientes pour le récepteur TP du TXA2 (souris obtenues par une collaboration avec Tom Coffmann, de Dukes University). Aucune thrombose n'a été détectée en l'absence du récepteur TP (score 0, n=8) (**Figure I-6A**). Ce résultat montre donc que l'agoniste plaquettaire mis en jeu dans l'agrégation plaquettaire est le TXA2.

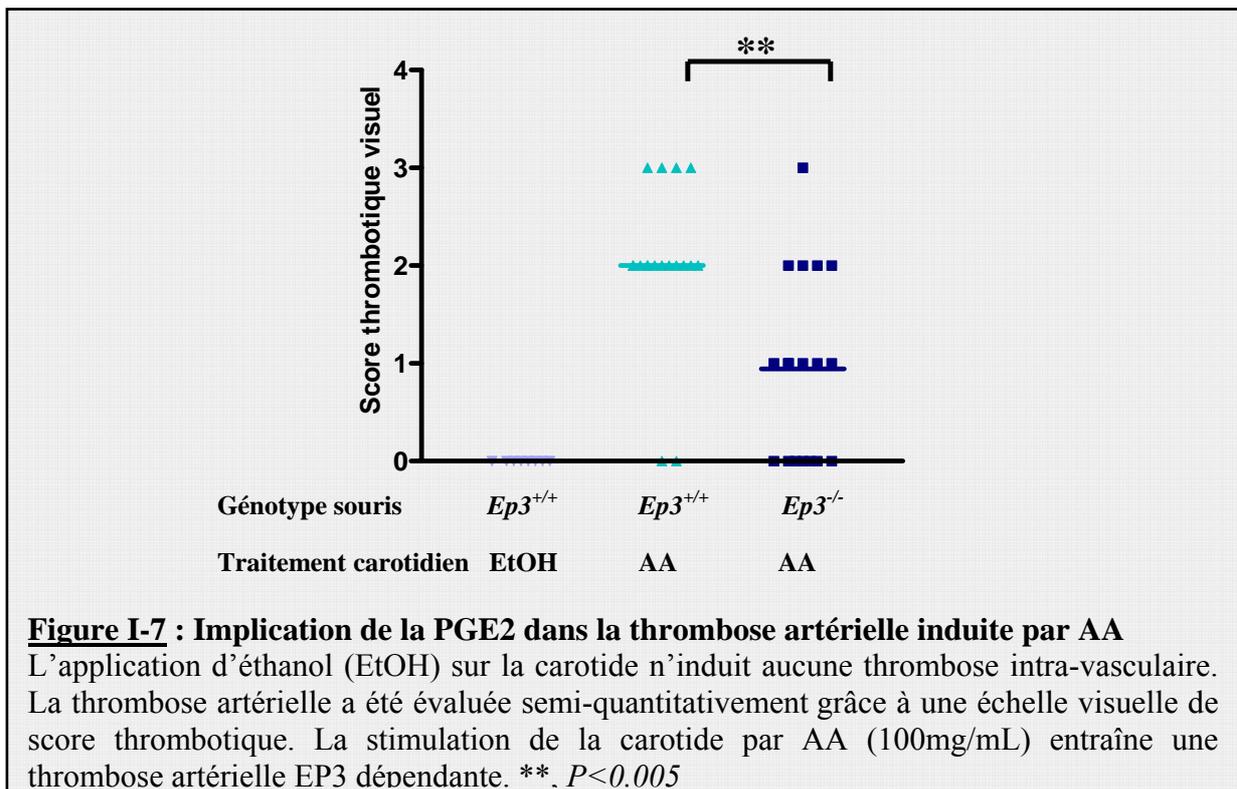


En conclusion, l'AA appliqué à la paroi carotidienne est métabolisé en TXA2, agoniste de l'agrégation plaquettaire et en PGE2. Ce modèle d'induction de la thrombose artérielle est donc idéal pour étudier l'implication de la PGE2 dans l'hémostase artérielle en situation inflammatoire (**Figure I-6B**).

b. Rôle de la PGE2 dans la thrombose artérielle induite par AA

i. Détection visuelle

L'utilisation de souris déficientes pour le récepteur EP3 de la PGE2 (souris $Ep3^{-/-}$)⁸⁴ a permis de définir le rôle du couple PGE2/EP3 dans la thrombose artérielle (**Figure I-7**). L'exposition d'éthanol (solvant de l'AA) au niveau de la paroi carotidienne respecte l'hémostase artérielle, puisqu'il n'induit pas de thrombose. Par contre, l'application péri-adventitielle d'AA sur la carotide de souris $Ep3^{+/+}$ entraîne la formation d'une thrombose stable. Mais, l'importance de la thrombose est significativement diminuée par l'absence du récepteur EP3 (0,9, n=18 vs. 2,0, n=18, $P<0.005$) (**Figure I-7**). Ce résultat indique que l'importance de la thrombose artérielle est dépendante de la présence du récepteur EP3. Et donc je peux conclure que la PGE2 a une action facilitatrice de la thrombose artérielle *in vivo*, sous réserve que EP3 soit un récepteur spécifique de la PGE2.



En examinant les scores thrombotiques obtenus, nous avons constaté une plus grande variabilité dans le groupe de souris $Ep3^{-/-}$ que dans le groupe $Ep3^{+/+}$. Ceci peut être dû à la subjectivité de l'expérimentateur. En effet, un biais possible de ce modèle est l'évaluation semi-quantitative de la thrombose. Dans le but de mesurer objectivement l'importance de la thrombose, notre équipe a développé un système de quantification de la thrombose artérielle en collaboration avec des ingénieurs en imagerie de l'institut.

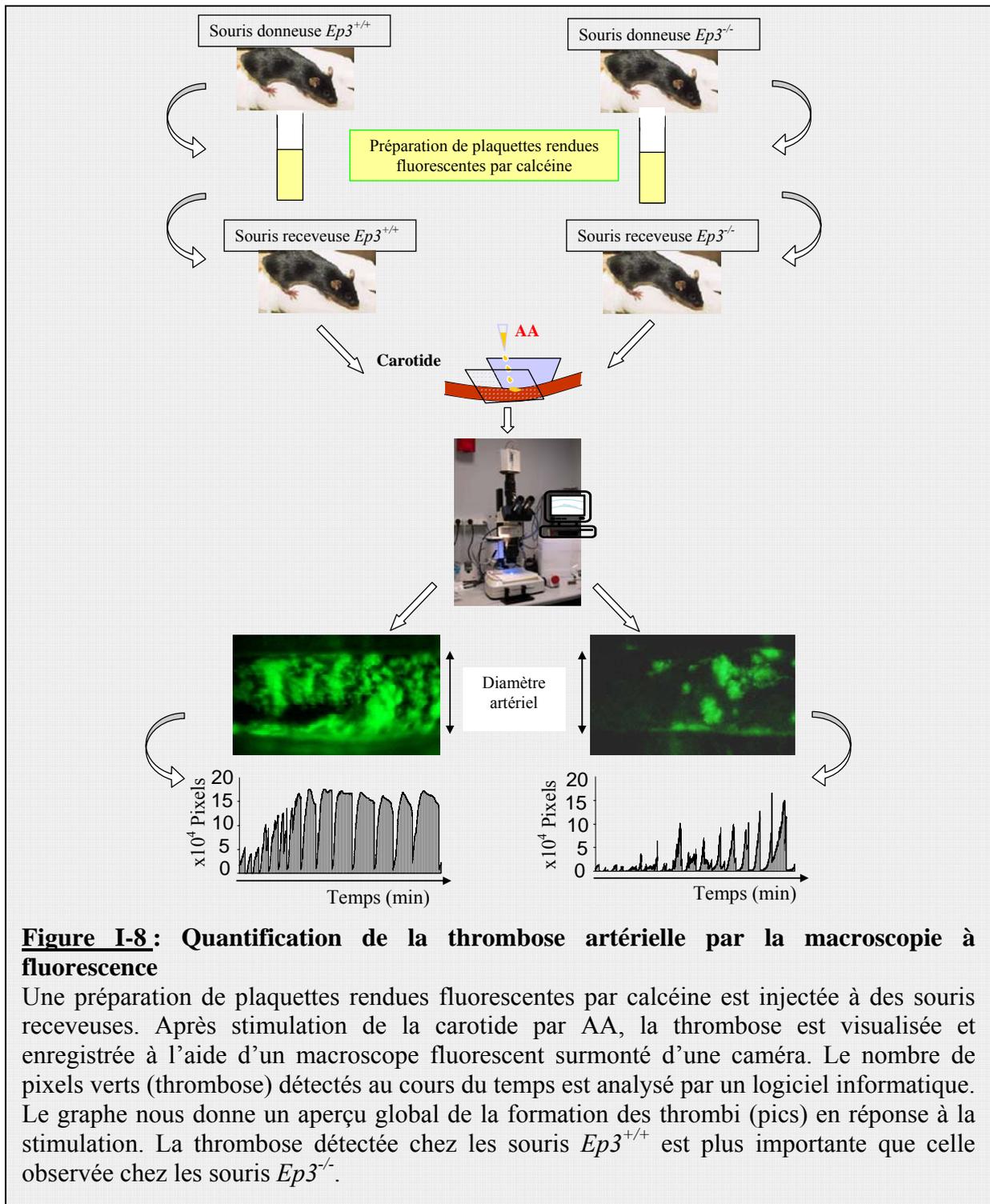
ii. Quantification

La détection de la thrombose artérielle *in vivo* est possible du fait de l'injection préalable de plaquettes rendues fluorescentes aux souris receveuses et après stimulation de leur carotide par l'AA (**Figure I-8**). Les plaquettes sont rendues fluorescentes par leur incubation avec de la calcéine-AM (calcéine acétoxyméthyl). L'acétoxyméthyl est un groupement non toxique qui fait entrer la calcéine dans la plaquette. L'hydrolyse du groupement AM par des estérases intra-cellulaires empêche l'externalisation de la calcéine du fait de ses charges ioniques et la rend fluorescente en lumière verte (longueurs d'onde d'excitation : 496 nm et d'émission : 516 nm). La thrombose apparaît donc en vert en fluorescence.

Ce dispositif de quantification de la thrombose artérielle utilise un nouveau matériel d'observation de la thrombose artérielle *in vivo* en temps réel : le Macroscope Fluorescent appelé le MacroFluo.

Le MacroFluo a trois caractéristiques. Son large champ d'observation permet l'observation de toute la carotide. Sa grande hauteur de travail permet de placer la souris directement sous l'objectif. Et enfin l'homogénéité de sa fluorescence émise permet de recueillir des informations fiables sur l'ensemble du champ observé. Ce dispositif est surmonté d'une caméra permettant l'enregistrement de la cinétique de la thrombose dans le courant artériel.

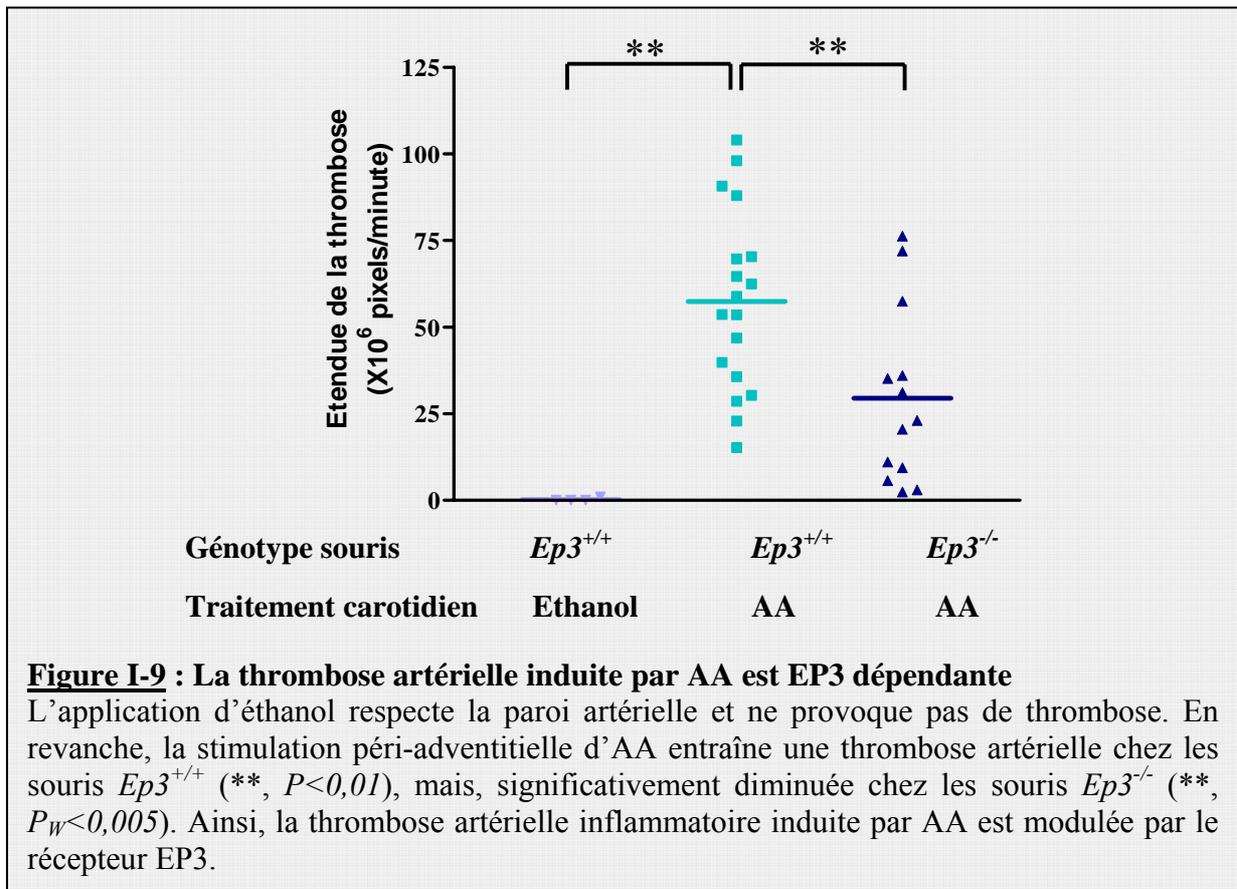
Après l'injection de plaquettes fluorescentes et la stimulation carotidienne par de l'AA, la dynamique de la thrombose sur un temps donné est donc enregistrée. Les images acquises lors de l'enregistrement (30 minutes) sont alors digitalisées et analysées par un logiciel informatique, qui nous permet de quantifier les pixels verts correspondant à la thrombose. L'intensité de la thrombose s'exprime en pixels/minute (**Figure I-8**).



J'ai ainsi comparé l'intensité de la thrombose artérielle induite par l'application d'AA sur des carotides de souris *Ep3*^{+/+} vs. *Ep3*^{-/-} injectées préalablement de plaquettes fluorescentes exprimant EP3 ou non (**Figure I-9**). Dans ces conditions, la thrombose intra-luminale détectée dans les carotides de souris *Ep3*^{+/+} est massive, occupant le plus souvent toute la lumière carotidienne. A l'inverse, la thrombose développée dans les souris *Ep3*^{-/-} est éparse et

instable. Les données analytiques de ces thromboses montrent qu'en l'absence du récepteur EP3, la thrombose est significativement réduite ($57.4 \pm 6.2 \times 10^6$ pixels/min, $n=18$ vs. $29.5 \pm 7.0 \times 10^6$ pixels/min, $n=13$, $P=0.006$) (**Figure I-9**).

Ainsi, la thrombose carotidienne qui se développe en réponse à l'exposition de la paroi à l'AA est dépendante du TXA2 et est augmentée par la présence du récepteur EP3. Ces résultats apportent la preuve du principe que la PGE2 peut jouer un rôle dans l'hémostase en facilitant la thrombose artérielle.

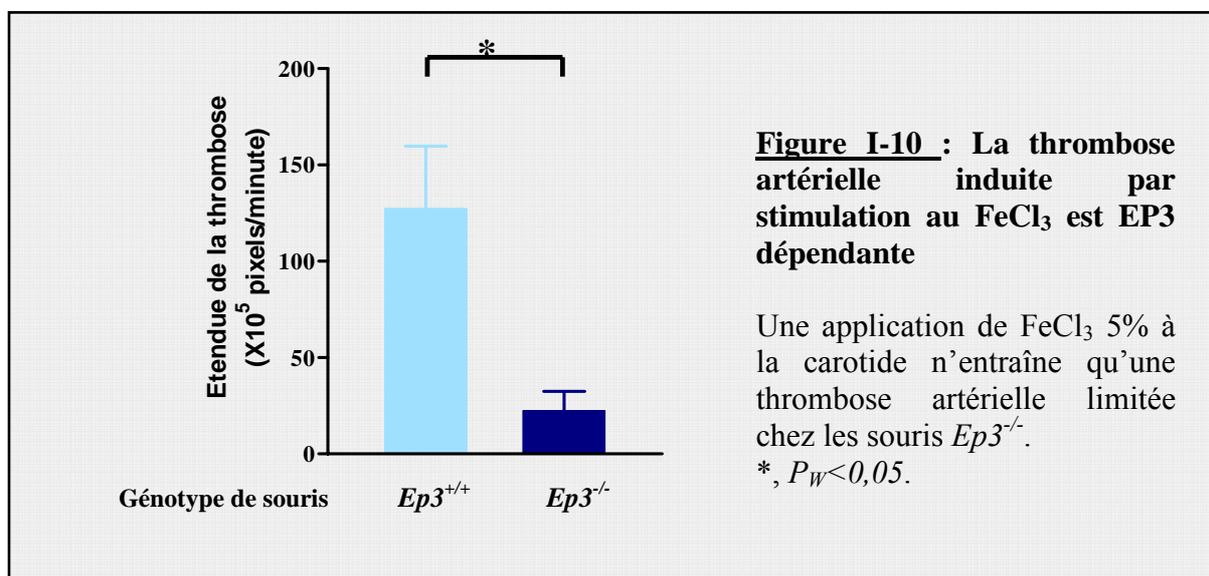


Biais de ce modèle :

L'inconvénient de ce modèle d'induction de la thrombose est que l'exposition de la paroi artérielle à de l'AA force la paroi à produire de la PGE2. L'utilisation de ce modèle d'induction de la thrombose par de l'AA ne permet donc pas de prédire que le couple PGE2/EP3 joue un rôle en physiopathologie cardio-vasculaire. L'étape suivante teste si ce résultat peut être étendu à des conditions dans lesquelles la stimulation de la voie de l'AA est d'ordre physiopathologique.

2. Modulation de la thrombose par le couple PGE2/EP3 dans un modèle de dénudation endothéliale

Pour tester ce point, j'ai utilisé un moyen d'induction de la thrombose déjà décrit dans la littérature : il s'agit de l'application péri-adventitielle de chlorure de fer (FeCl_3)¹⁹⁸. Une fois appliquée à la carotide, le FeCl_3 diffuse de la media vers l'intima et l'endothélium où il provoque la mort cellulaire des cellules endothéliales. La zone endothéliale atteinte est dénudée, à l'origine d'une inflammation et d'une thrombose. En effet, les plaquettes sont activées par l'exposition d'agonistes sous-endothéliaux, essentiellement le collagène. Dans ce modèle, la thrombose est dépendante de la dose de FeCl_3 employée. J'ai utilisé ici une faible dose de FeCl_3 (5%) pour pouvoir tester l'effet facilitateur de la PGE2 sur la thrombose artérielle ainsi induite, puisque l'on sait que l'effet facilitateur de la PGE2 ne peut être mis en évidence qu'après stimulation des plaquettes par des quantités sous-maximales d'agonistes. L'exposition de la carotide de souris $Ep3^{+/+}$ injectées de plaquettes fluorescentes $Ep3^{+/+}$ à du FeCl_3 5% provoque l'apparition d'une thrombose en environ 7 minutes, et est ensuite maximale, c'est à dire occlusive, à environ 15 minutes. A l'inverse, chez les souris $Ep3^{-/-}$ injectées de plaquettes fluorescentes dépourvues de EP3, la thrombose paraît moins étendue. Les résultats quantitatifs confirment cette observation : l'étendue de la thrombose est significativement diminuée chez les souris $Ep3^{-/-}$ par rapport aux souris $Ep3^{+/+}$ ($22,4 \pm 10,1 \times 10^5$ pixels/min, n=8, vs. $127,2 \pm 32,6 \times 10^5$ pixels/min, n=11 $P_w < 0,05$) (**Figure I-10**). Donc, le récepteur EP3 facilite la thrombose artérielle induite *in vivo* par le FeCl_3 . Ce qui signifie indirectement que la PGE2 a facilité *in vivo* l'action d'agonistes comme le collagène et l'ADP.



En conclusion, la quantité de PGE2 produite par la paroi artérielle en réponse à un stimulus inflammatoire est suffisante pour modifier l'hémostase locale et ainsi faciliter la thrombose locale. Mes expériences s'appuient sur le fait que la PGE2 agit en activant son récepteur EP3, ce qui a été démontré *in vitro*, et donc sur le fait que EP3 est spécifique de la PGE2, ce qui n'est pas montré *in vivo*. L'étude suivante consiste donc à déterminer si EP3 n'est activé que par la PGE2 pariétale ou si une autre molécule l'active aussi, et à déterminer si le récepteur EP3 mis en jeu dans la thrombose artérielle est plaquettaire ou pariétal.

III. Mode d'action du couple PGE2/EP3 dans la thrombose artérielle

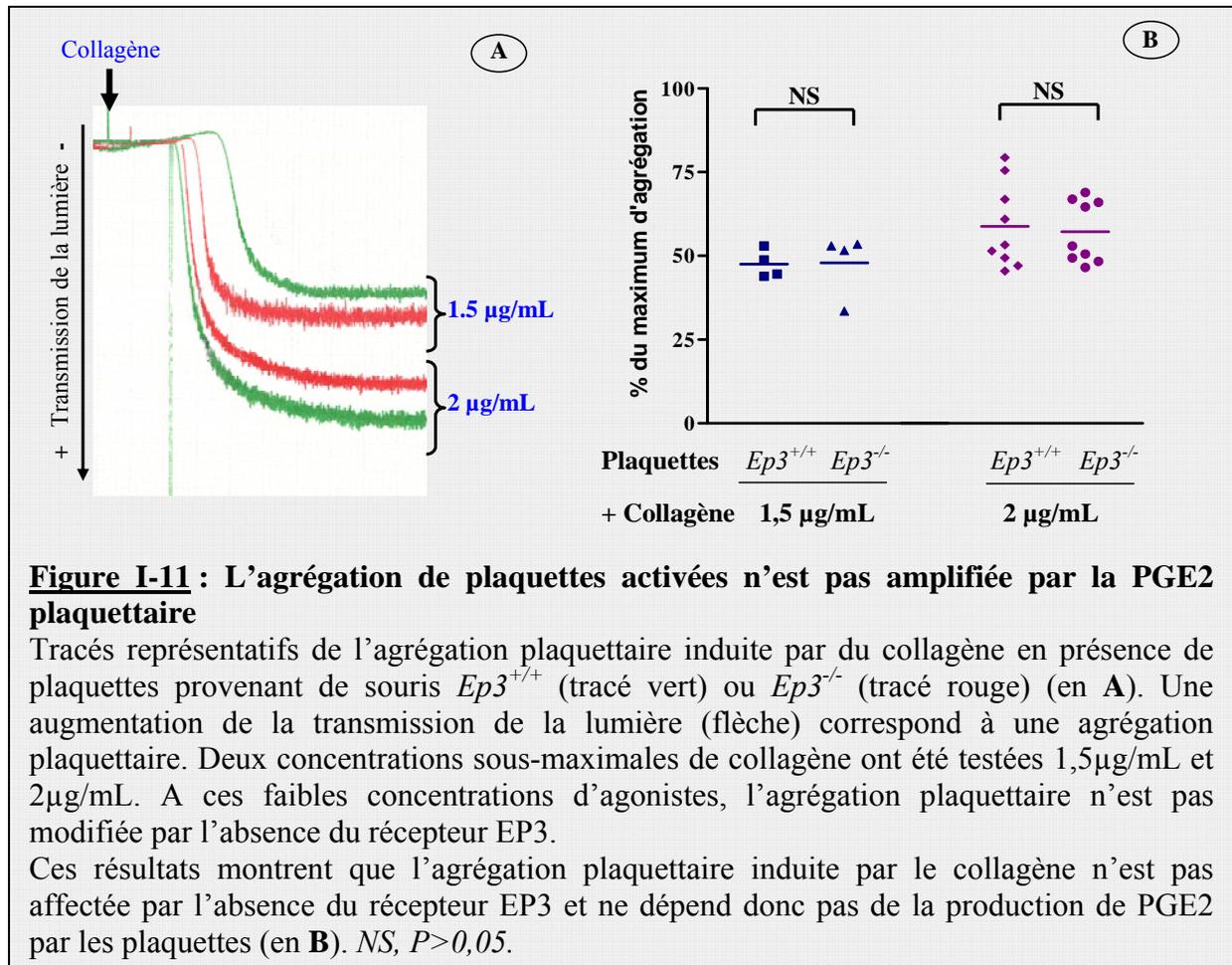
1. La PGE2 plaquettaire joue-t-elle un rôle dans la thrombose artérielle ?

Bien que la PGE2 soit produite par la paroi artérielle en réponse à une inflammation, il a été montré dans les années 70s que la PGE2 peut également être libérée par les plaquettes lors d'une agrégation plaquettaire¹⁹⁹. Cette étude suggère que la PGE2 plaquettaire agit dans l'amplification de la réponse plaquettaire c'est-à-dire dans le recrutement de plaquettes. Théoriquement, la PGE2 produite par la plaquette activée stimule son récepteur EP3 sur les plaquettes inactives et abaisse leur seuil d'activation. Ces plaquettes répondront mieux à l'ADP et au TXA2 libérés par les plaquettes activées. Ainsi, si la PGE2 est produite par les plaquettes activées, elle devrait faciliter l'amplification de l'agrégation plaquettaire.

J'ai donc examiné si la production plaquettaire de PGE2 joue un rôle dans l'agrégation plaquettaire *in vitro*. Sachant qu'il n'y a pas de PGE2 pariétale produite *in vitro*, toute différence d'agrégation entre les plaquettes *Ep3^{+/+}* et *Ep3^{-/-}* signifierait que l'activation plaquettaire produit suffisamment de PGE2 pour faciliter l'amplification.

J'ai effectué des tests d'agrégation en stimulant des plaquettes provenant de souris *Ep3^{+/+}* ou *Ep3^{-/-}* avec de faibles concentrations de collagène. Ainsi stimulées à des concentrations sous-maximales de collagène (1,5 et 2 µg/mL), les plaquettes de souris *Ep3^{+/+}* n'agrègent que partiellement (**Figure I-11**). Pour chacune des deux doses de collagène, l'amplitude de l'agrégation des plaquettes de souris *Ep3^{-/-}* est comparable à celle obtenue avec les plaquettes de souris *Ep3^{+/+}* (47,6 ± 2,1% de l'agrégation maximale, n=4 vs. 47,9 ± 4,2% de l'agrégation maximale, n=4, *P*=0,95 et 58,8 ± 4,2% de l'agrégation maximale, n=9 vs. 57,2 ± 3,0% de

l'agrégation maximale, $n=9$, $P=0,75$ respectivement à 1,5 et 2 $\mu\text{g/mL}$ de collagène) (**Figure I-11**). Ainsi, l'absence du récepteur plaquettaire EP3 ne modifie pas l'agrégation. Ces résultats montrent que la quantité de PGE2 produite par les plaquettes lors de leur agrégation n'est pas suffisante pour faciliter l'amplification de l'agrégation plaquettaire via son récepteur EP3.



En conclusion, la PGE2 produite par les plaquettes activées ne modifie pas l'agrégation *in vitro*. Ces résultats démontrent que l'origine de la PGE2 qui facilite la thrombose artérielle *in vivo* est pariétale et non plaquettaire.

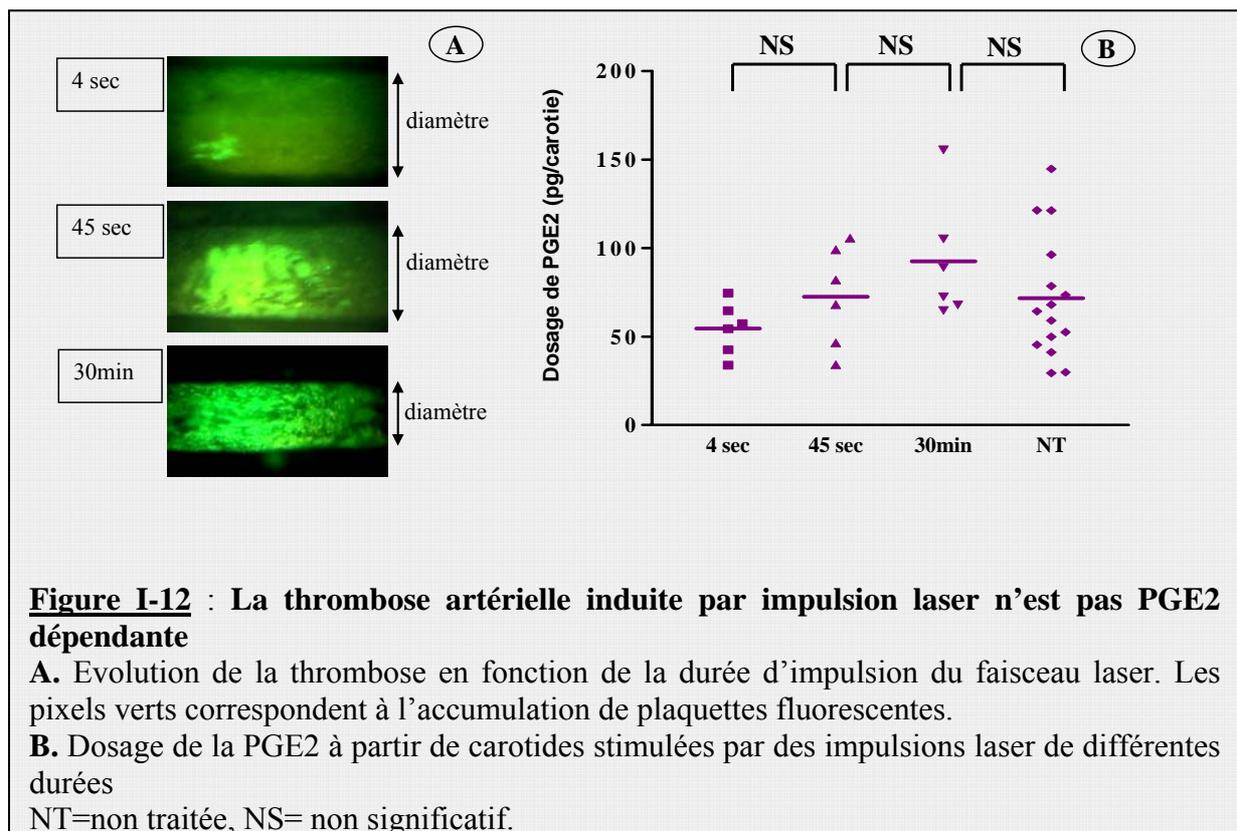
2. La PGE2 est-elle la seule molécule à agir sur le récepteur EP3 ?

Il n'est théoriquement pas exclu que le récepteur EP3 puisse être activé par une molécule autre que la PGE2 lors de la thrombose artérielle comme l'est le récepteur EP2²⁰⁰. Pour

répondre à cette question, il était nécessaire d'avoir un modèle de thrombose artérielle dans lequel la production pariétale de PGE2 soit nulle ou minimale.

Pour cela, j'ai examiné si l'induction de la thrombose artérielle par une technique photochimique entraîne une synthèse pariétale de PGE2²⁰¹. Cette méthode combine une injection intra-veineuse de rose bengale à une impulsion laser (Faisceau laser vert 1.5-mW, 540 nm; Melles Griot Inc). Après exposition de la carotide au faisceau laser, le rose bengale génère localement des radicaux libres, lesquels induisent des réactions oxydatives entraînant alors des lésions endothéliales. La lésion endothéliale est donc suivie d'une rapide adhésion plaquettaire et d'une thrombose artérielle.

Dans ce modèle, l'accumulation de plaquettes sur la paroi artérielle après seulement 4 secondes d'impulsions laser occupe déjà 1/10 du diamètre artériel de la carotide de souris sauvages. La thrombose artérielle est stable et massive (occupant les $\frac{3}{4}$ du diamètre artériel) après 45 secondes de stimulation par faisceau laser. Finalement, l'obstruction définitive du vaisseau est détectée après 30 minutes d'exposition de la carotide au faisceau (**Figure I-12**).



J'ai alors mesuré la production pariétale de PGE2. Aux différents temps d'impulsion laser, le contenu carotidien en PGE2 augmente faiblement (à 4secondes : $54,6 \pm 6,0$ pg/carotide, n=6,

à 45 secondes : $72,6 \pm 11,6$ pg/carotide, n=6, à 30 minutes: $92,5 \pm 14,1$ pg/carotide, n=6, $P_{ANOVA}=0,24$, NS) (**Figure I-12**). L'on peut noter que cette quantité pariétale de PGE2 ne dépasse pas la valeur de base de PGE2 produite par une carotide non traitée ($92,6 \pm 14,1$ pg/carotide, n=6 vs. $71,6 \pm 9,0$ pg/carotide, n=15, $P=NS$) (**Figure I-12**).

La thrombose induite par impulsion laser ne s'accompagne donc pas de production pariétale de PGE2. Ce modèle permet ainsi de rechercher une molécule autre que la PGE2 capable d'activer le récepteur EP3 lors de la survenue d'une thrombose en situation inflammatoire.

Après injection d'une faible concentration de rose bengale (5mg/Kg de souris) et stimulation de 30 minutes, une thrombose plaquettaire est détectée dans la lumière des carotides de souris $Ep3^{+/+}$ ou $Ep3^{-/-}$. Si une molécule, autre que la PGE2, est produite par la paroi en situation inflammatoire et agit sur le récepteur EP3, l'importance de la thrombose devrait être diminuée chez les souris $Ep3^{-/-}$. Mais l'étendue de la thrombose n'a pas été modifiée par la présence ou l'absence du récepteur EP3. Comme la différence entre les souris $Ep3^{+/+}$ vs. $Ep3^{-/-}$ disparaît en l'absence de PGE2 pariétale, j'en déduis qu'il n'y a pas d'autre molécule que la PGE2 qui active EP3.

Par ailleurs, même si la paroi ne produit pas de PGE2 en réponse à une lésion photochimique, les plaquettes agrégées ont dû relarguer de la PGE2. Si la PGE2 plaquettaire jouait un rôle, on aurait du constater une différence dans l'importance de la thrombose entre les deux groupes de souris $Ep3^{+/+}$ et $Ep3^{-/-}$. Comme aucune différence n'a été observée, ce résultat confirme que la production plaquettaire de PGE2 *in vivo* n'est pas suffisante pour faciliter une amplification de l'agrégation plaquettaire induite en situation d'inflammation.

En conclusion, la thrombose artérielle *in vivo* est facilitée par la PGE2 produite par l'inflammation de la paroi et la PGE2 active spécifiquement son récepteur EP3. Le récepteur EP3 étant exprimé de façon ubiquitaire, il m'a fallu cependant vérifier que le récepteur EP3 exprimé dans la paroi vasculaire n'a pas aussi joué un rôle. Le récepteur EP3 exprimé par la cellule endothéliale n'a-t-il pas, une fois activé par la PGE2, augmenté l'adhésion plaquettaire et ainsi favorisé la survenue d'une thrombose locale ?

3. Quel récepteur EP3 est en jeu dans la thrombose artérielle ?

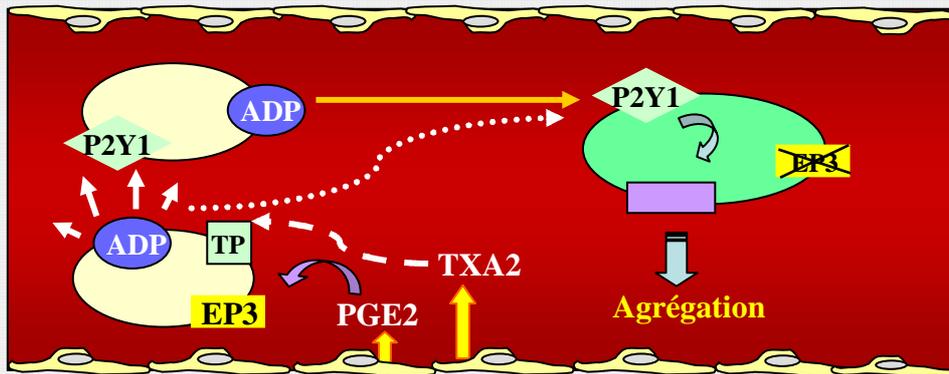
Pour cette étude, la thrombose artérielle est induite par l'application péri-adventitielle d'AA à la carotide (méthode décrite dans le paragraphe II).

Pour identifier le récepteur EP3 impliqué, j'ai comparé l'importance de la thrombose artérielle chez des souris $Ep3^{+/+}$ ou $Ep3^{-/-}$ respectivement injectées de plaquettes fluorescentes $Ep3^{-/-}$ ou $Ep3^{+/+}$ avec celle obtenue pour le groupe de souris $Ep3^{+/+}$ injectées de plaquettes fluorescentes $Ep3^{+/+}$. L'analyse des données entre le groupe de souris $Ep3^{+/+}$ injectées de plaquettes $Ep3^{+/+}$ et le groupe de souris $Ep3^{-/-}$ injectées de plaquettes $Ep3^{+/+}$ ne montrait pas de différence, faisant penser que le récepteur EP3 mis en jeu est le récepteur plaquettaire. Mais, lorsque j'ai comparé l'importance de la thrombose détectée chez des souris $Ep3^{+/+}$ recevant des plaquettes $Ep3^{-/-}$ avec celle détectée chez des souris $Ep3^{+/+}$ recevant des plaquettes $Ep3^{+/+}$, aucune différence n'a non plus été relevée. Si le récepteur mis en jeu dans la thrombose artérielle était le récepteur plaquettaire, la réponse thrombotique des souris $Ep3^{+/+}$ injectées de plaquettes $Ep3^{-/-}$ aurait dû être significativement inférieure au groupe de souris $Ep3^{+/+}$ injectées avec des plaquettes $Ep3^{+/+}$.

L'interprétation de ces résultats nous a conduit à incriminer l'amplification de l'agrégation, notamment par l'ADP, comme biais de mon expérience. En effet, les plaquettes natives et donc non fluorescentes de la souris receveuse ont été activées par la production cumulée de TXA2 et de PGE2 pariétale. Et, une fois activées, ces plaquettes peuvent libérer l'ADP stocké dans leurs granules α pour recruter les plaquettes fluorescentes via les récepteurs plaquettaires P2Y1 et P2Y12 entraînant ainsi la formation d'une thrombose « parasite » (**Figure I-13A**).

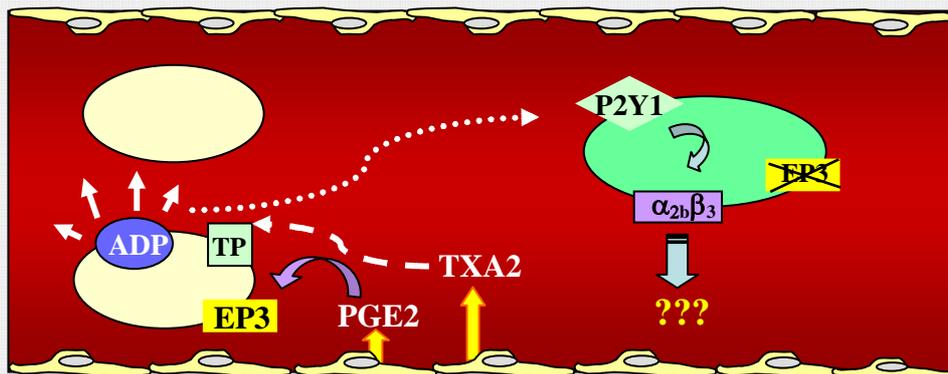
Il était donc nécessaire d'inhiber au moins partiellement l'amplification de l'agrégation par les plaquettes natives non fluorescentes, afin de déterminer l'origine du récepteur EP3 en jeu dans la thrombose artérielle. Pour cela, des souris déficientes pour le gène P_{2y1} ont été injectées de plaquettes fluorescentes $Ep3^{+/+}$ ou $Ep3^{-/-}$ (**Figure I-13B**). Dans ce cas-là, les plaquettes natives, même si elles sont activées par le TXA2 pariétal et si elles libèrent de l'ADP, n'amplifieront pas la réponse thrombotique en recrutant des plaquettes fluorescentes.

A. Souris receveuse $P2y1^{+/+}$ - injection de plaquettes fluorescentes $EP3^{-/-}$



AA  **Obtention d'une thrombose « parasite » dépendante de la voie de l'ADP**

B. Souris receveuse $P2y1^{-/-}$ - injection de plaquettes fluorescentes $EP3^{-/-}$



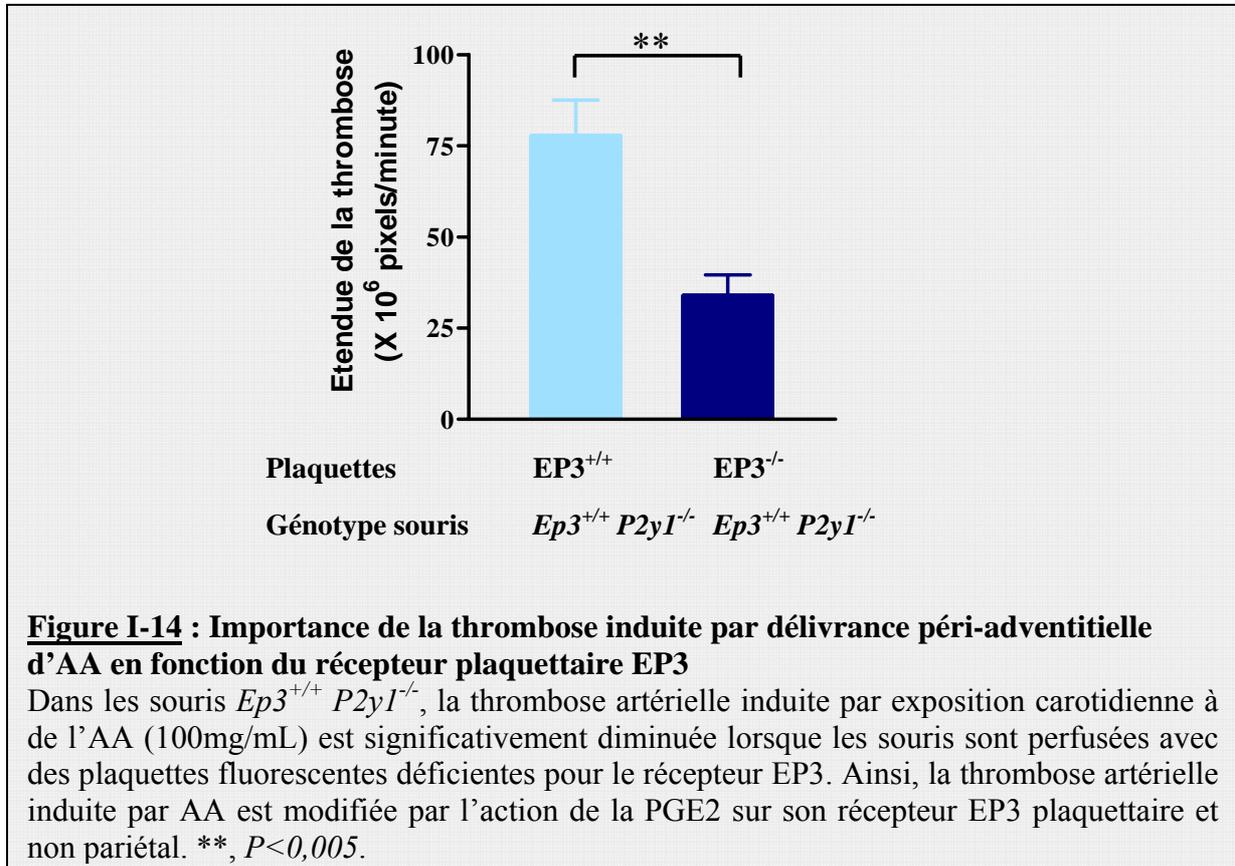
AA  **Elimination de la voie de l'ADP au niveau des plaquettes natives**

Figure I-13 : Modèle étudié pour déterminer le récepteur EP3 mis en jeu dans la thrombose artérielle

Les plaquettes natives (en gris) de souris $P2y1^{+/+}$ sont activées par l'application d'AA à la paroi carotidienne et la synthèse consécutive de TXA2 et de PGE2. Cette activation entraîne une libération d'ADP, agoniste plaquettaire par les granules α . La stimulation du récepteur P2Y1 par l'ADP correspond alors à un mode de recrutement qui ne tient pas compte de la présence du récepteur EP3 au niveau des plaquettes fluorescentes (en vert). Ce modèle n'est donc pas le modèle adéquat pour identifier l'implication du récepteur EP3 plaquettaire dans la thrombose artérielle.

L'utilisation de souris déficientes pour le récepteur P2Y1 élimine ce biais en limitant le recrutement par l'ADP sécrété par les plaquettes natives.

Dans ces conditions, la thrombose développée chez les souris $P2y1^{-/-}$ en présence du récepteur plaquettaire EP3 est plus importante que celle détectée en son absence ($77,7 \pm 9,8 \times 10^6$ pixels/min, n=8 vs. $33,9 \pm 5,7 \times 10^6$ pixels/min, n=6, $P < 0.005$) (**Figure I-14**).



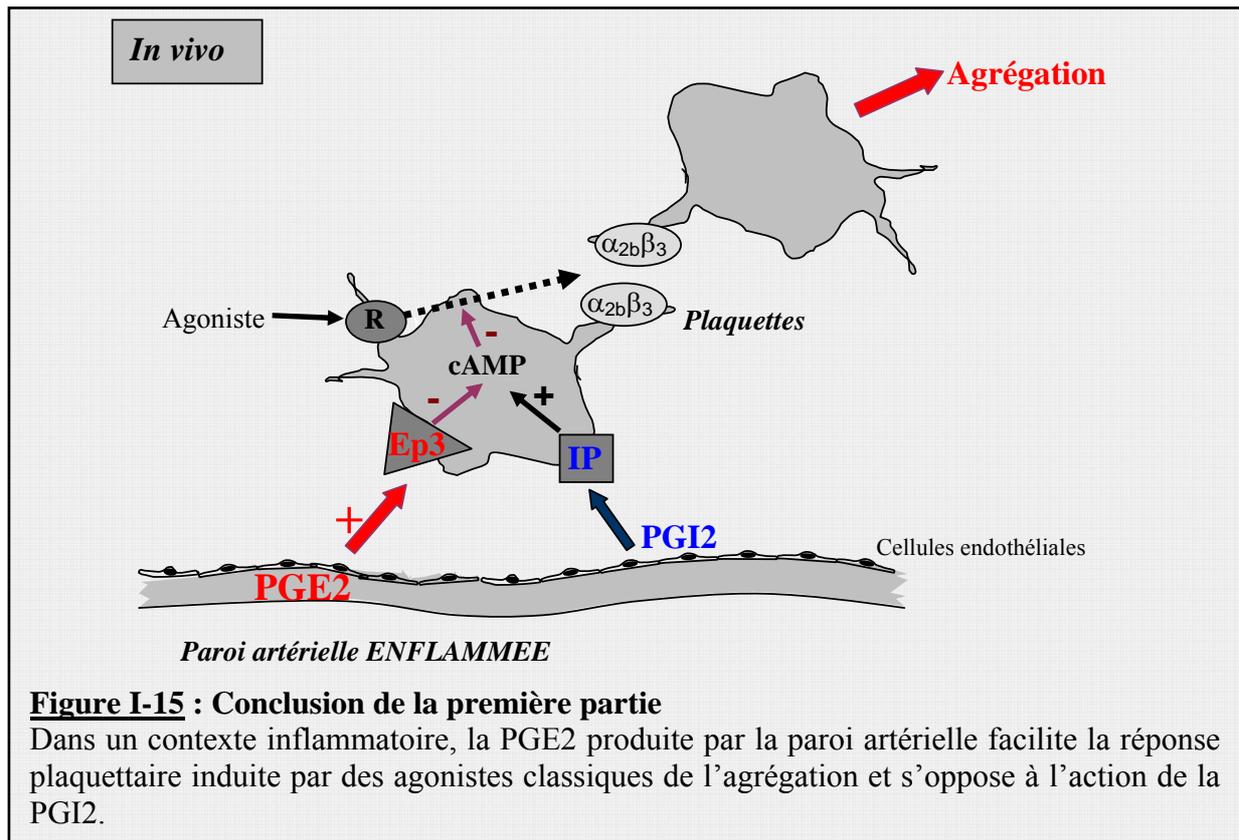
En conclusion, la PGE2 module la thrombose par son récepteur EP3 plaquettaire, et non par son récepteur pariétal.

IV. Conclusion

In vitro, l'on sait que la PGE2 à de faibles concentrations joue un rôle amplificateur de l'agrégation plaquettaire en présence d'agonistes plaquettaires classiques. Cette première partie de ma thèse a testé si ce rôle connu de la PGE2 a une signification en physiologie. La réponse est oui.

Mon hypothèse de travail a été que la paroi enflammée produit de la PGE2 qui agit sur son récepteur EP3 plaquettaire pour sensibiliser les plaquettes à leurs agonistes. Mon hypothèse

est maintenant vérifiée. J'ai montré qu'un état inflammatoire de la paroi artérielle entraîne l'augmentation de la production pariétale de PGE2. J'ai ensuite montré que la PGE2 produite par la paroi active spécifiquement son récepteur EP3 sur les plaquettes. La conséquence de cette activation en est la facilitation de l'agrégation plaquettaire en présence d'agonistes spécifiques (**Figure I-15**). Donc les plaquettes sont bien sensibilisées à leurs agonistes par la PGE2.



Ainsi, dans des conditions d'inflammation physiopathologiques, la PGE2 est capable de modifier l'équilibre homéostatique intra-vasculaire en faveur d'un état pro-thrombotique. Et nous avons donc la réponse à la question que nous nous posions : la PGE2 joue effectivement un rôle dans l'hyper-thrombogénicité locale engendrée par l'inflammation tissulaire. Ceci suggère que la balance PGE2/PGI2 serait plus importante que la balance PGI2/TXA2 dans le contrôle de l'hémostase locale.

Forte de ces résultats, je me suis donc intéressée à une maladie inflammatoire chronique de la paroi artérielle : l'athérosclérose. Plus particulièrement, j'ai testé l'influence du couple PGE2/EP3 dans la thrombogénicité des plaques d'athérosclérose.

Partie II

*Rôle de la PGE2 dans la thrombogénicité de
la plaque d'athérosclérose*

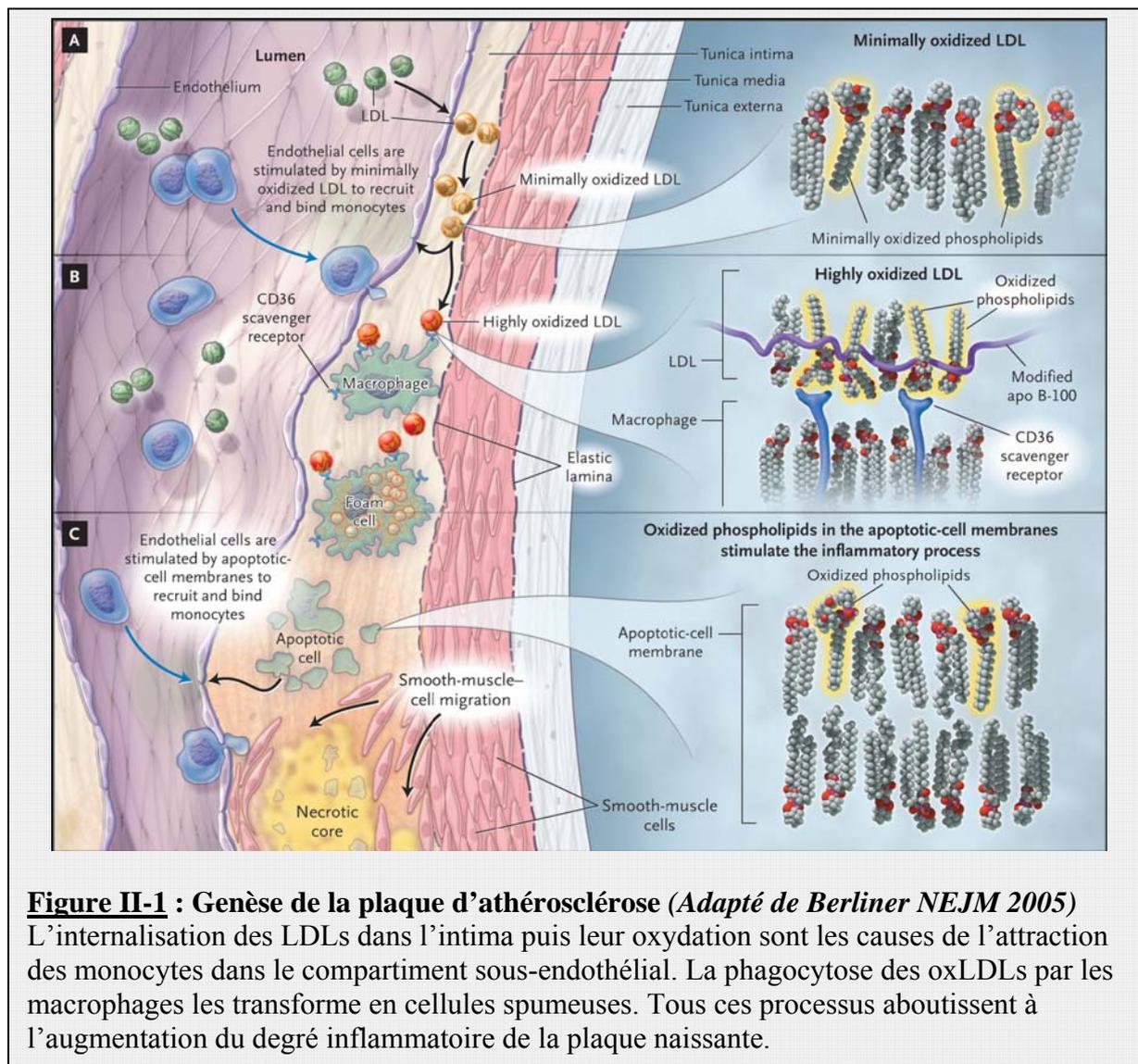
INTRODUCTION

I. La plaque d'athérosclérose mature : vue mécanistique de sa formation

Les anatomopathologistes du XVII^{ème} siècle ont observé des dépôts blanchâtres sur la paroi interne des artères. Ces dépôts ont tout d'abord été comparés à de la bouillie de farine (« athara » en grec) qui justifie la dénomination d'athérome dès 1755 par Albrecht von Haller. Lobstein, en 1833 définit ces athéromes comme des durcissements locaux ou scléroses de la paroi artérielle. C'est seulement au début du siècle dernier que Marchand englobe les notions de maladie fibreuse et scléreuse dans le terme d'« athérosclérose ».

1. L'infiltration accrue des lipides et leur oxydation

L'étiologie de cette maladie n'est pas claire. Un grand pas a été franchi en 1989 avec la démonstration *in vivo*, chez le lapin, que les lipoprotéines de basses densité riches en cholestérol (LDL ou *low density lipoprotein*) s'accumulent préférentiellement dans les régions de prédilection de l'athérosclérose^{202,203}. Cette hypothèse d'infiltration lipidique représentait déjà un des grands courants de pensée émis par Rudolf Virchow en 1856. L'accumulation des LDLs dans la paroi artérielle relève de plusieurs causes potentielles intriquées: les contraintes hémodynamiques locales, une modification de la perméabilité vasculaire et une modification de la production de NO. De plus, ces mécanismes sont potentialisés par des facteurs de risque comme l'hypercholestérolémie, l'hypertension ou des agents oxydants²⁰⁴. Les forces de cisaillement et les turbulences qu'exerce le flux sanguin au niveau des bifurcations artérielles²⁰⁵ sont des causes de dysfonction endothéliale, qui engendreraient une augmentation de la perméabilité endothéliale²⁰⁶, et une perte de fonction de NO^{207,208}. Ces modifications pourraient ainsi favoriser l'infiltration lipidique dirigée par des interactions ioniques entre les lipoprotéines et les protéines matricielles comme les protéoglycanes ou le collagène^{209,210}. Une fois dans l'intima, les LDLs subissent des modifications oxydatives (oxLDLs ou moxLDLs)²¹¹ les rendant plus adhérentes à la matrice extracellulaire²⁰⁹ et limitant leur évacuation (**Figure II-1A**). Les oxLDLs deviennent fondamentalement différents des LDL non oxydés dans la mesure où ils sont capables d'activer les cellules endothéliales²¹², et d'induire des réactions inflammatoires.



2. Invasion de la lésion par les macrophages : bénéfique ou délétère ?

La caractérisation des cellules constituant la plaque d'athérosclérose a permis de mettre en évidence le caractère inflammatoire de la maladie, qui avait déjà été précédemment décrit par Virchow. Les macrophages sont les cellules inflammatoires les plus nombreuses de la plaque d'athérosclérose²¹³. Ce sont les oxLDLs qui sont en partie responsables de l'invasion de la plaque par des monocytes (**Figure II-1B**). En effet, les oxLDLs amplifient la production de chemokines par les cellules endothéliales ou les CMLV^{214,215,216} mais aussi l'expression de molécules d'adhésion, comme les sélectines²¹⁷, les CAMs^{218,219,220,221} par l'activation dans ce dernier cas de la voie du NF- κ B qui va promouvoir l'expression de ces gènes par la cellule endothéliale²²². Ces molécules d'adhésion participent au « rolling » et à l'adhésion des

monocytes sur la surface endothéliale activée²²³ et ainsi permettent leur pénétration dans l'intima^{224,225}. Une fois sur place, les macrophages phagocytent les lipides oxydés sans pouvoir les digérer. Progressivement, les macrophages bourrés de lipides oxydés en meurent et ainsi libèrent des radicaux libres qui aggravent l'oxydation des oxLDLs (« highly oxidized LDL »). D'autres macrophages internalisent ces oxLDLs hautement modifiés notamment par leurs récepteurs « scavengers » CD36^{226,227}. La digestion de ces lipides hautement oxydés n'est pas non plus complète et participe aussi à la formation de cellules spumeuses²²⁸. Donc, si l'intervention des macrophages est indispensable pour tenter de réduire la lésion (effet bénéfique initial), elle apparaît finalement délétère par l'augmentation de l'oxydation des LDLs et de l'inflammation *in situ*. Nous verrons aussi plus loin que leurs rôles décrits ici ne sont pas limitatifs.

3. L'amplification de l'inflammation ?

Au sein de la plaque, la transformation des macrophages en cellules spumeuses active leur apoptose. Leurs débris cellulaires vont accroître le centre nécrotique de la lésion, perpétuant la réponse inflammatoire au sein de la plaque²²⁹. De plus, l'activation des macrophages stimule les lymphocytes T présents dans la plaque par deux mécanismes. D'une part, ils exposent des épitopes antigéniques reconnus par les cellules T, et d'autre part, ils produisent beaucoup de cytokines pro-inflammatoires^{213,230}. En fait, plusieurs types de cellules T ont été détectées dans la plaque²³⁰, en particulier les cellules T helper de type 1, 2 ou 3 qui sont sous le contrôle des cellules T-régulatrices (Treg).

L'activation des Th1 induit la synthèse de cytokines pro-athérogéniques, notamment IFN γ ²³¹. Ce profil de cytokines est contrebalancé par la production de cytokines de type anti-athérogéniques par les cellules Th2 ou Th3²³². D'où il a été suggéré que le développement de la lésion est sous le contrôle d'une balance entre Th1 et Th2/Th3 à un même stade de la maladie²³³. Mais des données récentes démontrent que l'action de ces différentes cellules est en fait sous le contrôle des cellules Treg²³⁴. Ainsi les cellules Treg1²³⁵ ou les cellules Treg naturelles CD4⁺CD25⁺ limitent le développement des lésions²³⁶.

La plaque d'athérosclérose est donc un véritable foyer d'inflammation chronique contrôlé par de nombreuses cytokines inflammatoires pro ou anti-athérogéniques.

4. Une capsule pour isoler et contenir la lésion

La progression de l'athérogenèse s'accompagne de la dédifférenciation et de la migration de CMLV de la media vers l'intima (**Figure II-1C**) sous le contrôle des oxLDLs²³⁷ ou de facteurs libérés par les cellules inflammatoires^{238,239} ou endothéliales²⁴⁰. Après avoir migré au niveau de l'intima, les CMLV prolifèrent sous le contrôle du PDGF, un facteur de croissance, et adoptent un phénotype sécrétoire pour synthétiser en abondance des protéines matricielles. La constitution d'une chape riche en CMLV et en collagène^{241,224} stabilise la plaque d'athérosclérose. Cependant, les CMLV de la chape sont plus sensibles à l'apoptose que les CMLV de la media, expliquant partiellement l'instabilité de certaines plaques²⁴².

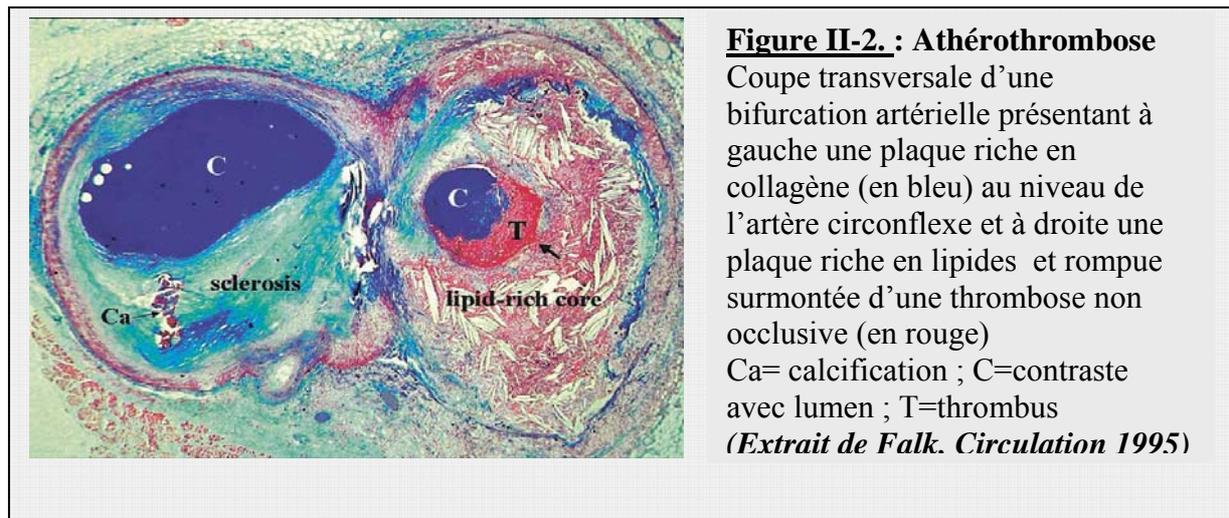
5. Sclérose de la plaque

Progressivement, des calcifications apparaissent au sein de la plaque, et sont en partie responsables de la rigidité de la plaque. Ces calcifications correspondent à des dépôts d'hydroxyapatite et de matrice organique²⁴³ comme du collagène et des protéines telle que l'ostéopontine (OPN)²⁴⁴ sécrétée par les cellules de la plaque^{245,246}. L'OPN possède des fonctions de chemoattraction²⁴⁷ mais intervient aussi dans la différenciation cellulaire²³². Ainsi, la plaque évoluée devient rigide, peu flexible et susceptible de rompre.

Tous ces phénomènes ne sont pas seulement séquentiels mais se superposent dans le temps. Bien évidemment, cette description succincte ne décrit que les grands axes du « paradigme » actuellement accepté pour la formation de la plaque.

II. L'athérothrombose

La progression de la plaque est un processus lent et prend des décennies. Il est certain qu'aujourd'hui nous ne savons toujours pas prédire quand une plaque va entraîner un accident clinique, comme l'infarctus du myocarde. Cela signifie que des mécanismes qui lient la plaque à l'apparition de la thrombose à sa surface n'aient pas été identifiés (**Figure II-2**).



1. Définition de l'athéromatose

Sur la base de critères histologiques, l'évolution de la plaque d'athérosclérose a été décomposée en différents stades lésionnels²⁴⁸. D'après la classification AHA (*American Heart Association*), la complication la plus avancée de la plaque athérosclérotique (lésion de type VI) correspond à la rupture et la survenue d'une thrombose au site de rupture d'une plaque fibrolipidique. C'est cette notion que définit le terme « athéromatose ». Cette complication de la plaque est alors à l'origine d'accidents cardiaques aigus tels que l'angor instable, l'infarctus du myocarde ou la mort cardiaque subite.

La découverte de la rupture de plaque et la détection de la thrombose sur le lieu de la rupture ont d'abord été considérées dans les années 1930 comme l'évolution de la plaque se manifestant par à un événement coronarien fatal²⁴⁹. La relation rupture/thrombose a ensuite été documentée par de nombreuses études anatomopathologiques dans les années 1960^{250,251}. Il fallut attendre les années 1990 pour qu'il apparaisse que la rupture de la surface de la plaque peut induire une thrombose locale sans entraîner obligatoirement un accident coronarien aigu fatal^{252,253}. Cela montre que la réponse à la rupture n'est pas univoque et donc suggère que le contenu ou « l'activité » de la plaque influence cette réponse à la rupture. Il a alors fallu étudier les mécanismes qui aboutissent à la rupture de la plaque.

2. *La rupture de la plaque*

Les premières hypothèses mettaient en cause la taille de la plaque, ou plutôt son volume, et le degré de sténose occluant la lumière du vaisseau^{254,255} : plus une plaque est importante, plus la sténose est hémodynamiquement sévère, et plus la plaque risque de se rompre. Mais l'observation de ruptures sur des plaques faiblement ou moyennement sténosantes a imposé une révision de cette hypothèse^{256,257}. La survenue de la rupture sur plaque de volume modéré s'expliquait alors mieux par la notion de plaque « fragile » ou encore dénommée « vulnérable ».

Aujourd'hui, il apparaît clairement que la composition de la plaque joue un rôle prédominant dans l'induction d'une rupture et/ou d'une thrombose bien plus que sa répercussion hémodynamique.

a. Vulnérabilité de la plaque

i. Définition de la vulnérabilité

La vulnérabilité de la plaque est définie par l'existence d'une chape fragile, c'est-à-dire prompte à se rompre. Cette fragilité peut concerner toute la chape ou plus fréquemment résulter d'un amincissement localisé de celle-ci.

La vulnérabilité de la plaque n'est pas corrélée à la sévérité de son degré de sténose²⁵⁸ mais à sa composition. L'importance du centre lipidique, dû à l'accumulation des lipides extracellulaires, tout comme l'épaisseur de la chape fibreuse ou encore le degré d'inflammation de la plaque^{258,259} sont les éléments principaux qui déterminent la vulnérabilité d'une plaque²⁶⁰. Ainsi, une plaque très jeune ou avancée peut correspondre à cette définition.

ii. Les causes de la vulnérabilité

Les plaques vulnérables sont caractérisées par une apoptose importante, une néovascularisation et une réaction inflammatoire prononcée qui favorise la dégradation de la matrice extracellulaire de la plaque²⁵⁹.

✓ L'apoptose

Au niveau de la chape fibreuse, la mort des CMLV mais aussi l'absence de réplication des CMLV diminue la synthèse de collagène fragilisant ainsi les plaques^{261,262}, dont la résistance mécanique est amoindrie et qui ont ainsi plus tendance à se rompre.

L'importance de l'apoptose dépend du stade de développement de la plaque d'athérosclérose, de l'état inflammatoire de la plaque²⁶³ et notamment de son environnement oxydatif, responsable de dommages génomiques au niveau des différents types cellulaires²⁶¹.

Ainsi, l'apoptose est néfaste et fragilise la lésion athérosclérotique^{264,265,266} augmentant considérablement son instabilité.

✓ La néovascularisation

L'épaisseur de la plaque limite la diffusion de l'oxygène et l'apport de nutriments dans la média sous-jacente. Des vasa vasora naissent alors en grand nombre dans l'adventice mais aussi dans les plaques, sous l'influence de cytokines inflammatoires produites au sein de la plaque^{267,268}. Le développement de la lésion athérosclérotique s'accompagne ainsi d'une néovascularisation importante aggravant l'état inflammatoire des plaques^{269,270}, la survenue d'hémorragies intra-plaques²⁷¹ et augmentant sa fragilité, la plaçant dans un état à haut risque de rupture²⁷².

✓ La dégradation de la matrice extracellulaire

Outre leur fonction phagocytaire, les macrophages synthétisent des enzymes protéolytiques et notamment les métalloprotéases (MMPs)²⁷³ que sont les collagénases, les élastases et les stromélysines²⁷⁴, en réponse à divers stimuli^{275,276,277}. Le profil de production des MMPs par les macrophages mais aussi les CMLV de la chape est très large et inclut entre autres la MMP-1, la MMP-2, la MMP-3, la MMP-7 ou la MMP-9^{273,278}. L'effet principal de l'activation de ces enzymes protéolytiques est la dégradation du collagène²⁷⁹ rendant la plaque fragile et susceptible de se rompre. Ainsi, la sur-expression de ces enzymes au niveau des plaques symptomatiques^{278,280} est corrélée à la vulnérabilité des plaques.

Il est donc probable que lors d'épisodes de sur-inflammation de la plaque, la dégradation de la matrice extracellulaire des plaques par les MMPs diminue sa résistance et la rend vulnérable.

b. Les forces physiques (qui entraînent la rupture de la plaque vulnérable)

A côté de la composition histologique de la plaque²⁸¹, sa géométrie est aussi un facteur critique de rupture. Le flux sanguin qui s'exerce au niveau de la plaque est perturbé : de laminaire et rapide, il devient turbulent et lent. Ceci crée alors des zones de stagnation ou d'inversion du flux²⁸², notamment aux épaules de la plaque, zones très fragilisées de prédilection de rupture de la plaque^{283,284}.

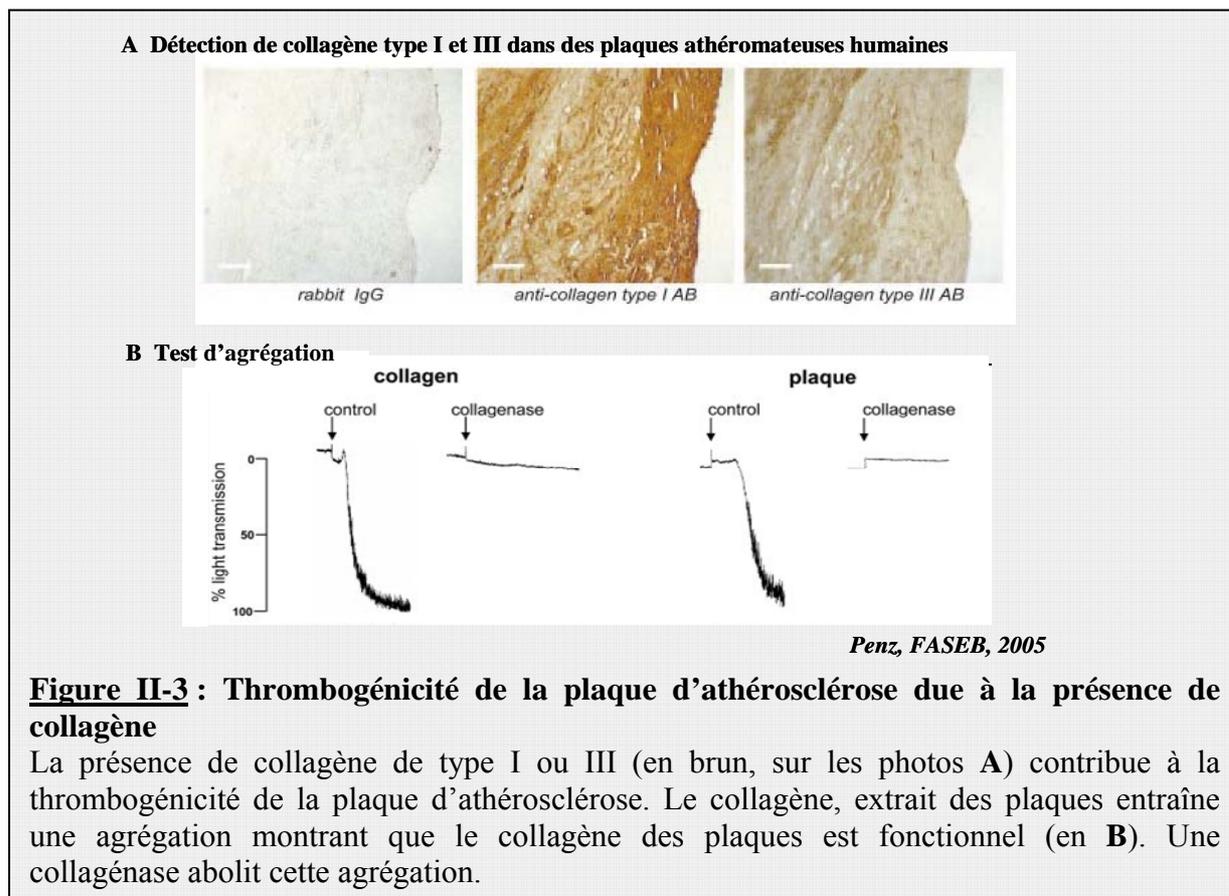
En conclusion, le contenu inflammatoire de la plaque contribue à l'augmentation de la vulnérabilité de la plaque, en augmentant l'apoptose, la néovascularisation et l'activation des MMPs qui fragilisent la chape. Cette fragilité de la plaque aboutit à la rupture probablement sous l'effet physique de déformations locales de la paroi. Une rupture de la plaque expose alors le contenu thrombogène de la plaque aux plaquettes sanguines.

3. La thrombogénicité de la plaque

Les mécanismes qui rendent une plaque hautement thrombogène ne sont pas tous connus. Mais il a été montré que la plaque contient de nombreux facteurs comme le facteur tissulaire (FT), le facteur de coagulation VIII, le collagène, le facteur vWF, ou les oxLDLs qui contribuent à sa thrombogénicité.

a. Importance du collagène

L'abondance de CMLV au sein de la plaque d'athérosclérose entraîne la synthèse accrue de collagène de type I et III^{285,286}. Ces deux formes de collagène offrent une surface idéale d'adhésion pour les plaquettes par leur glycoprotéine GpIbα^{Nieuwenhuis, 1985 678 /id}²⁸⁵ et facilitent l'agrégation plaquettaire (**Figure II-3**) en activant la glycoprotéine GpVI²⁸⁶ plaquettaire après rupture de la chape.



b. Présence du facteur tissulaire

La présence du FT fonctionnel^{287,288} a été mise en évidence au sein de plaques d'athérosclérose humaines^{289,290}. Sa localisation dans le centre lipidique des plaques d'athérosclérose²⁹¹ à proximité des cellules spumeuses^{289,292,288} suggère que sa synthèse est réalisée par les macrophages stimulés par les oxLDLs^{293,288}. Cette hypothèse est en adéquation avec l'observation qu'un régime hypocholestérolémiant diminue la synthèse de FT au sein des plaques²⁹⁴.

L'activité pro-coagulante du FT peut s'exercer à deux niveaux. D'une part, il participe, en coordination avec le facteur VII et aussi le facteur VIII à la formation du thrombus au contact de la zone rompue. D'autre part, le FT contenu dans les microparticules libérées par la plaque peut induire un état pro-coagulant dans la microcirculation régionale^{288,263,295}. Mais l'activité du FT est modulée dans les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules spumeuses par la présence d'un inhibiteur du FT, le TFPI^{296,297}. Globalement, le FT est un facteur thrombogénique de la plaque.

c. Les autres facteurs pro-agrégants

Le potentiel thrombogénique de la plaque est augmenté par la présence d'autres facteurs pro-agrégants tels que les oxLDLs, le cholestérol sulfaté, l'ADP et la fibronectine. La rupture de la plaque d'athérosclérose peut libérer tout ou partie de ces facteurs qui sont autant d'éléments capables de stimuler les plaquettes sanguines et de participer à la survenue de la thrombose.

L'oxydation des LDLs dans les plaques d'athérosclérose aboutit à la formation de moxLDLs et d'acide lysophosphatidique (LpA) et leur accumulation dans le centre lipidique de la plaque. Ces composés provoquent un shape change des plaquettes et amplifient l'agrégation plaquettaire en présence d'agonistes augmentant ainsi le potentiel thrombogène de la plaque^{298,299,300}.

De plus, le cholestérol sulfate, retrouvé au niveau des LDL mais aussi dans les plaques aortiques humaines adhère spécifiquement aux plaquettes³⁰¹ et augmente la réponse plaquettaire induite par des agonistes classiques comme l'ADP ou la thrombine³⁰². Par ailleurs, la présence du facteur vWF, principalement dans les cellules endothéliales à la surface des plaques³⁰³ contribue également à la thrombogénicité de la plaque³⁰⁴.

En conclusion, la rupture de la plaque vulnérable entraîne une thrombose locale du fait de l'exposition de son contenu au flux sanguin. Ce contenu est thrombogène de par la présence du collagène, du FT et des lipides oxydés. Donc, pour des plaques similaires en taille et chez des souris de même âge, l'on devrait obtenir une réponse thrombotique semblable.

4. Imprédictibilité de l'athérothrombose

a. Chez l'homme : les données cliniques

L'athérothrombose entraîne des complications cliniques comme les syndromes ischémiques aigus, l'angor instable, l'infarctus aigu du myocarde, engendrant dans de nombreux cas la mort soudaine du patient. Malheureusement, la prévention primaire de tels accidents cardiovasculaires est encore impossible, car les facteurs de déclenchement ne sont pas connus : l'athérothrombose n'est pas prédictible. Le tabagisme, le régime alimentaire hypercholestérolémiant, une prédisposition génétique (la population noire est plus touchée

que la population blanche) sont autant de facteurs qui augmentent le risque de la plaque, mais leur relation à l'athéromatose n'est pas claire³⁰⁵. L'abondance de ces facteurs de risque reflète la variabilité de la maladie, mais ne permet pas de prédire quand une plaque va se rompre et thromboser. Ultime preuve de notre méconnaissance, le traitement actuel des patients à risque ne prévient que partiellement les récurrences d'accidents cardiovasculaires^{306,307,308,309}.

b. Chez l'homme : les données histologiques

La thrombose a été trouvée par les anatomo-pathologistes sur deux types d'altérations de la plaque humaine : la rupture franche de la plaque et l'érosion de l'endothélium.

La rupture franche (**Figure II-4**) se caractérise par une brèche dans la plaque d'athérosclérose d'étendue variable. Elle survient généralement sur une chape fibreuse fine qui encapsule un centre athéromateux inflammatoire dû à la présence de macrophages et de cellules T^{310,241,292}. La rupture peut s'étendre jusque dans le centre lipidique de la plaque, et met les plaquettes sanguines à son contact, à partir duquel la thrombose se développe jusqu'à occlure la lumière vasculaire. Mais, certaines thromboses sur rupture sont discrètes et asymptomatiques : ces ruptures sont identifiées par un aspect multicouche qui correspond à des réparations successives de la chape (**Figure II-4**) et d'ailleurs contiennent un nombre important de CMLV immatures^{258,311,312}. A l'extrême, les autopsies ont mis en évidence la présence de rupture sur des plaques coronariennes avancées sans aucune trace de thrombose^{253,313}. Le fait que ces ruptures ne déclenchent pas de thrombose à la surface de la plaque peut être expliqué par l'efficacité de la fibrinolyse locale. Une autre explication possible est que la plaque n'est pas assez thrombogène, c'est à dire que le contenu de la plaque ne déclenche pas la thrombose.

Donc, la rupture ne suffit pas en elle-même à entraîner une thrombose massive.

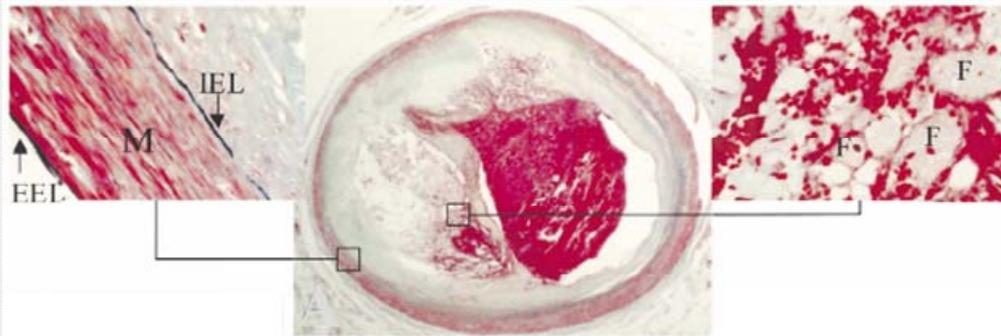
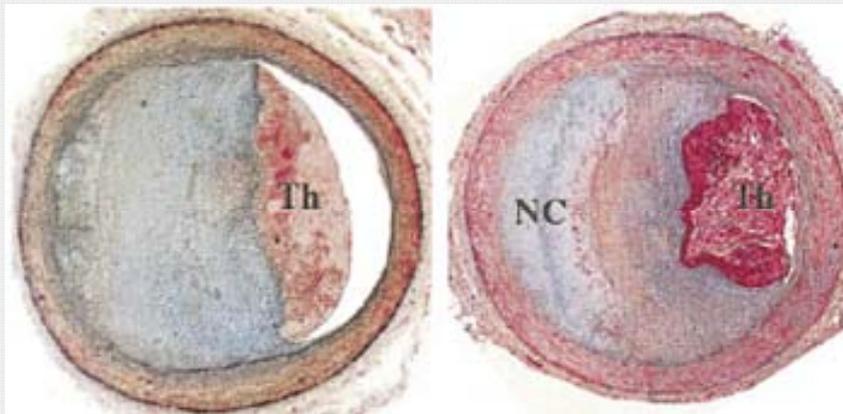
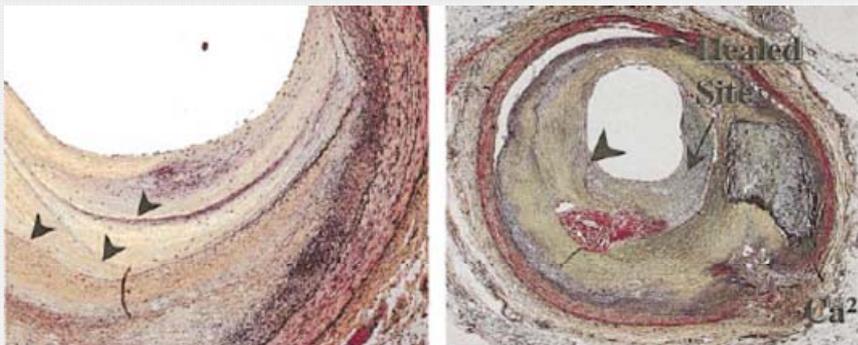
Inversement, l'absence de rupture ne protège pas de la thrombose. Les érosions superficielles des plaques (30% des cas) (**Figure II-4**) sont décrites par une absence localisée de cellules endothéliales, réalisant une dénudation endothéliale. La dénudation de la surface endothéliale entraîne l'exposition de la chape, mais pas de l'intérieur de la plaque. La plupart des plaques érodées ne présentent pas de centre nécrotique ; seules quelques cellules inflammatoires éparses sont présentes à côté de l'abondance de CMLV^{314,315}. La thrombose ne se focalise qu'à la surface de la plaque sans envahir la plaque et bien souvent se localise au niveau de

l'épaule distale de la plaque²⁸⁴. A l'extrême, des petites plaques simplement érodées peuvent provoquer des thromboses massives.

c. Chez la souris

L'ensemble des données de la littérature suggère que la thrombose spontanée sur plaque est un évènement rare. Dans notre laboratoire, nous avons testé sur des souris de même fond génétique, de même âge et soumises aux mêmes conditions d'élevage et de nutrition l'effet d'une rupture de plaque. Nous pouvons affirmer qu'il y a une grande variabilité dans la réponse thrombogénique, alors que les plaques paraissent similaires.

En conclusion, toutes ces observations suggèrent une variabilité très importante de la thrombogénicité des plaques. Les études anatomo-pathologiques nous permettent de dire que la rupture joue un grand rôle dans la survenue des thromboses, mais nous autorise aussi à dire que la rupture ne suffit pas à expliquer la thrombose. La plaque a une capacité variable à déclencher la thrombose : sa thrombogénicité est modulable.

Rupture de plaqueD'après Bezerra, *Cardiol Pathology*, 2001**Erosion de plaque**D'après Virmani, *ATVB*, 2000**Plaque « réparées » après érosion ou rupture**D'après Virmani, *ATVB*, 2000**Figure I-4 : Exemples d'athéromatose de plaques rompue, érodée et réparée**

Exemple de rupture franche ayant entraîné un infarctus du myocarde aigu fatal pour le patient. La chape fibreuse contient peu de CMLV et le centre nécrotique contient des cellules spumeuses (F). Au niveau médial, la limitante élastique interne (IEL) est dégradée. Les érosions ont lieu sur des plaques riches en CMLV et proéroglycannes. Quand il est présent (photo de droite: NC), le centre nécrotique ne communique pas avec le thrombus luminal (Th). Les plaques avec des érosions (gauche) « réparées » (tête de flèche) sont constituées de plusieurs couches de collagène et sont riches en CMLV. Les plaques présentant des ruptures (droite) « réparées » (flèche) contiennent de nombreuses CMLV et une matrice riche en collagène.

III. Hypothèse : L'inflammation de la plaque module l'athéromatose.

La plaque d'athérosclérose est une lésion évoluant sous le contrôle de l'inflammation vers sa rupture. C'est encore l'inflammation qui rend la plaque fragile (vulnérabilisation) et de fait favorise la rupture. L'abondance des facteurs thrombogéniques notamment le collagène, le FT ou encore les oxLDLs, présents dans la plaque explique la réponse thrombogénique. Cependant, de nombreux arguments montrent que la survenue de la thrombose n'est pas expliquée seulement par la rupture. Donc, il existe des facteurs régulant la thrombogénicité de la plaque. Comme la plaque est un foyer inflammatoire chronique, j'ai recherché un médiateur inflammatoire qui influence la réponse thrombotique de la plaque.

L'on sait que l'une des voies de l'inflammation est la voie de l'AA et que la stimulation de cette voie induit la production de prostanoides sous la dépendance de l'isoforme COX-2.

Ces prostanoides sont sans doute impliqués dans l'athérosclérose, parce que la COX-2 est un marqueur de risque en clinique humaine³¹⁶, est co-localisée dans les plaques d'athérosclérose humaines avec les macrophages^{317,22,318,23,319} (**Figure II-5**) et la mPGES-1^{22,23,320} (**Figure II-6**).

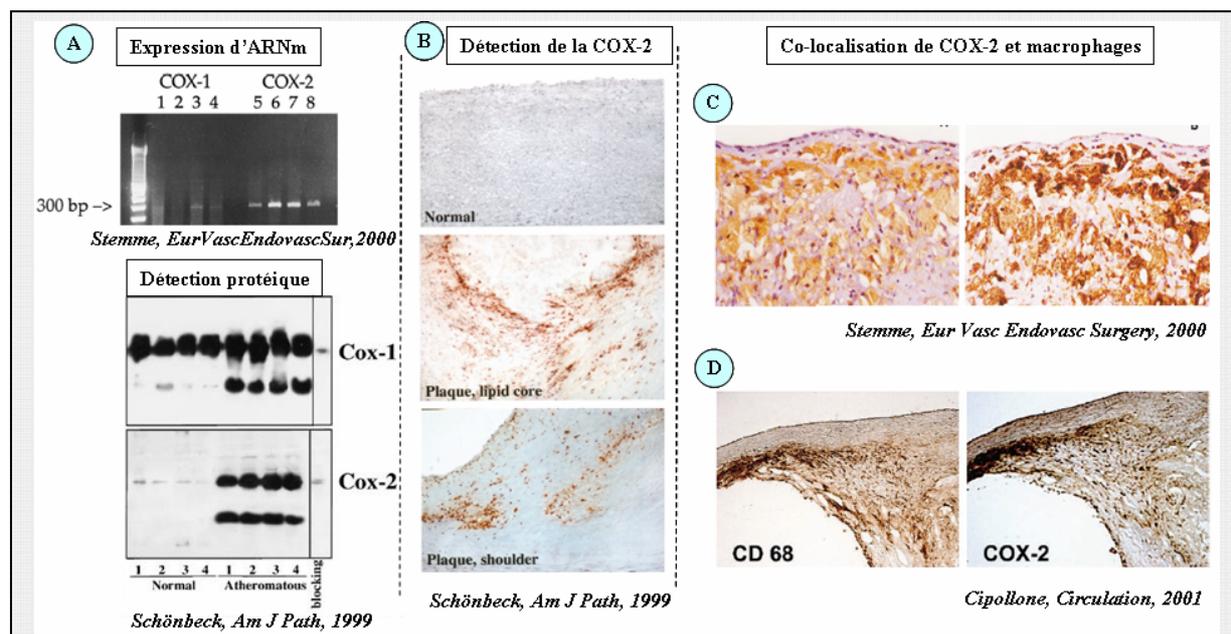


Figure.II-5 : Détection de COX-2 dans les plaques d'athérosclérose humaines en co-localisation avec les macrophages

Des études RT-PCR, Westren Blot (**A**) ou immunohistologiques (**B**) ont permis la détection de l'expression la COX-2 au niveau des plaques athérosclérotiques. Elle se localise au sein des plaques dans les régions riches en macrophages (**C**), et notamment au niveau des épaules de plaque (**D**).

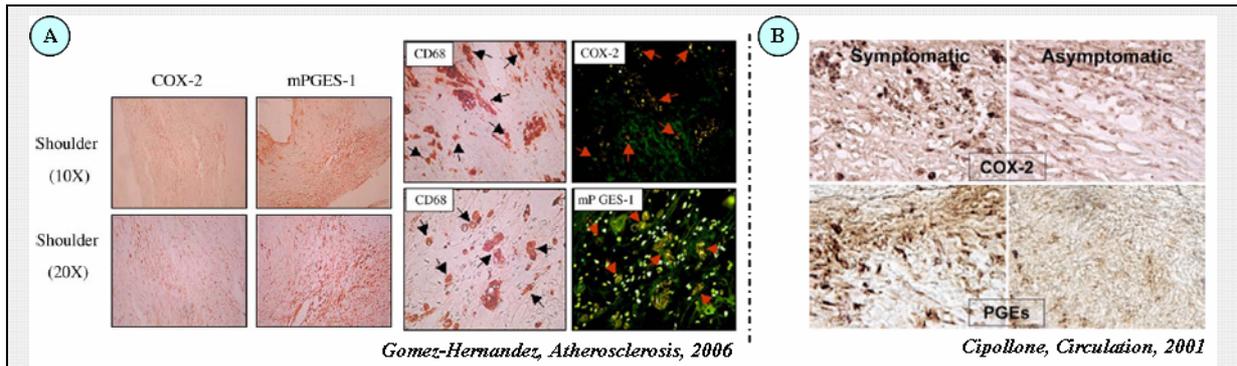


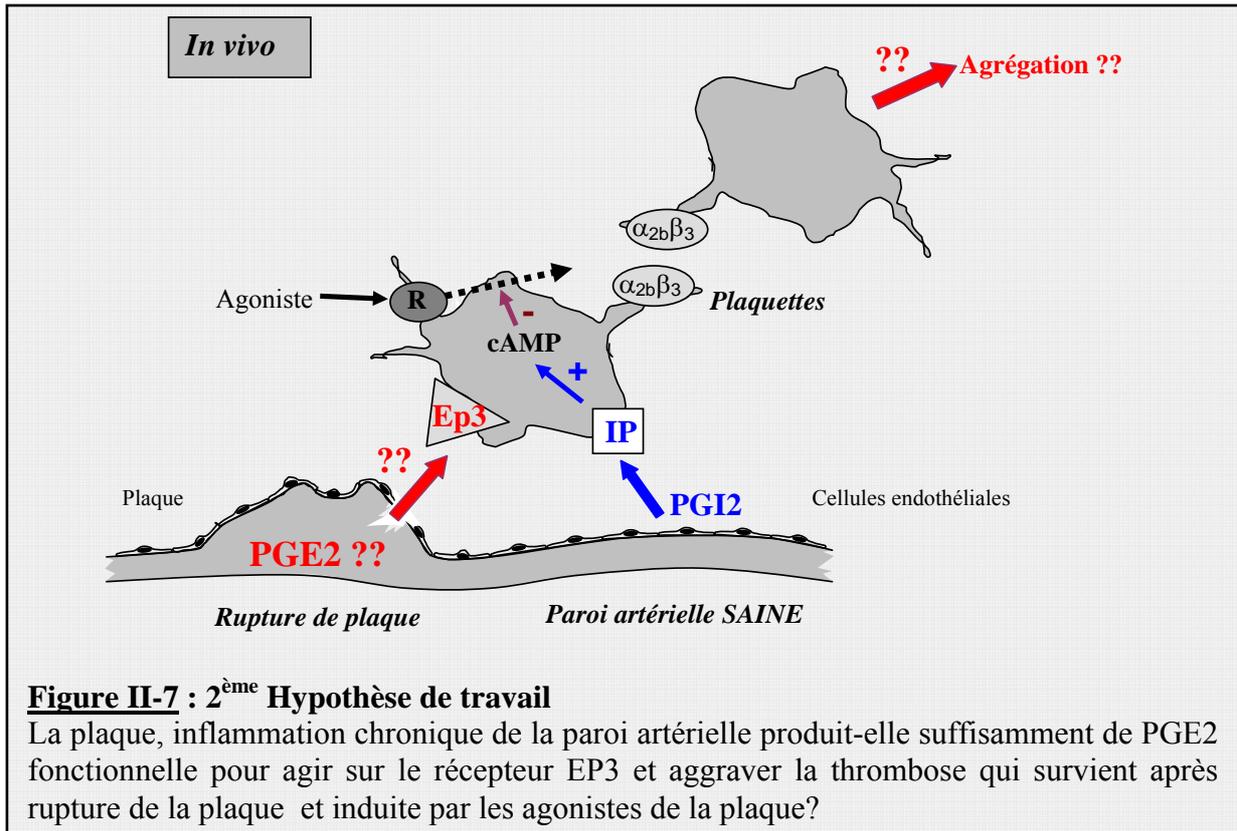
Figure II-6 : Co-localisation COX-2 et mPGES-1 au sein des plaques d'athérosclérose humaines

Diverses études ont détecté la présence de la mPGES-1 en co-localisation avec la COX-2 au sein des plaques d'athérosclérose (A et B). Dans les plaques humaines symptomatiques, la détection de ces deux enzymes est plus marquée ce qui montre que l'inflammation induit les expressions de la COX-2 et de la mPGES-1 dans les plaques.

L'on sait que l'activation de la COX-2, modifie *in vitro* le profil de production des prostanoïdes au profit d'une augmentation quasi-exclusive de PGE2 dans des monocytes/macrophages^{7,8}. Cette donnée suggère que la PGE2 est produite par les macrophages de la plaque. L'on sait aussi (première partie de ma thèse) que la production de PGE2 par la paroi artérielle enflammée facilite la thrombose artérielle via son récepteur EP3. Mais son rôle dans l'athéromatose est à définir et à démontrer.

Donc, la question qui a guidé nos hypothèses a été de déterminer si la voie de l'AA produit un médiateur susceptible de rendre compte de la variabilité de la thrombogénicité de la plaque. Mon hypothèse est donc que le médiateur en question est la PGE2 qui sensibilise les plaquettes au contact de la plaque et ainsi aggrave l'athéromatose (**Figure II-7**).

Pour tester ces hypothèses, j'ai examiné si la plaque produit de la PGE2, si cette PGE2 intra-plaque est fonctionnelle et peut être libérée par la plaque pour agir sur les plaquettes. J'ai utilisé plusieurs modèles d'induction de la thrombose à la surface de la plaque pour déterminer le rôle de la PGE2 dans l'athéromatose.



RESULTATS

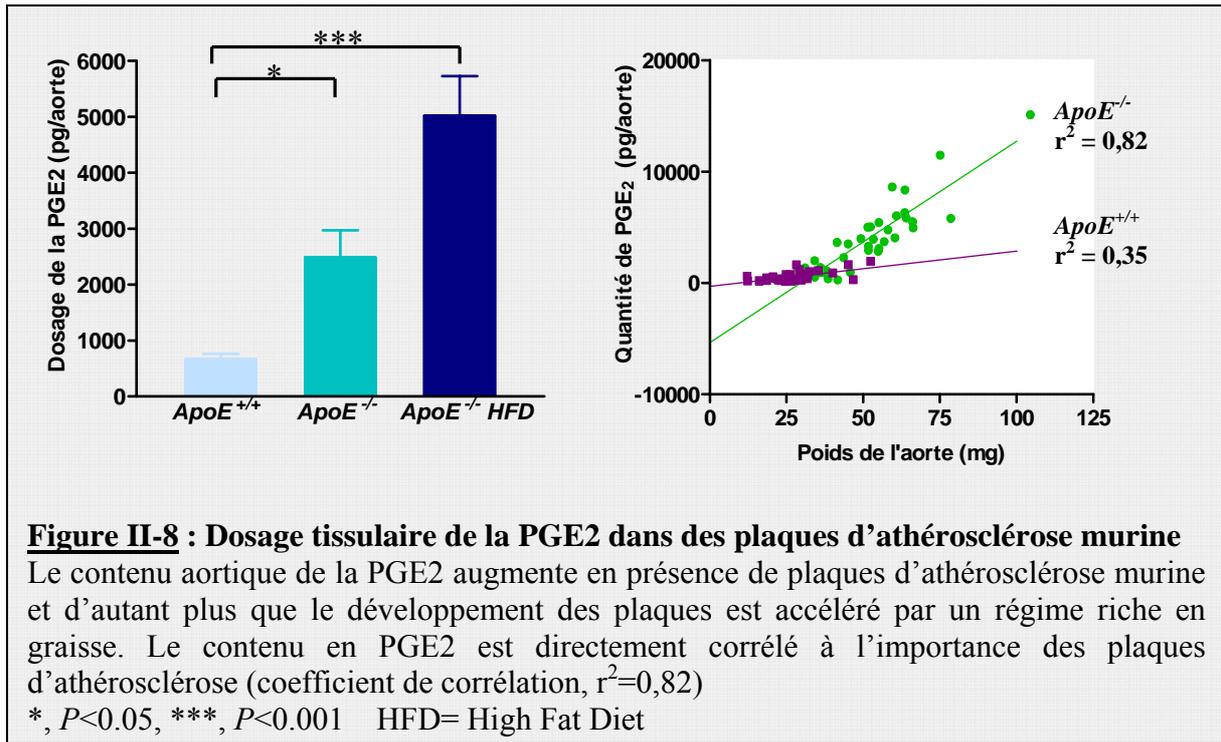
Pour tester le rôle de la PGE2 dans l'athéromatose, j'ai utilisé la lignée de souris invalidées pour le gène l'apolipoprotéine E ($ApoE^{-/-}$)^{321,322}, disponible dans le laboratoire. L'ApoE est une protéine ubiquitaire et constitutive des chylomicrons, des HDL ou des VLDLs. Elle joue un rôle dans le transport de ces lipoprotéines et l'élimination de leur remnants (partie de la lipoprotéine résiduelle après délivrance de la plus grande partie de son contenu lipidique aux tissus périphériques)³²³. L'absence du gène de l'ApoE cause alors une hypercholestérolémie. La lignée de souris $ApoE^{-/-}$ développe ainsi spontanément des plaques d'athérosclérose³²⁴. Les lésions athérosclérotiques développées dans les artères de souris $ApoE^{-/-}$ ressemblent à celles développées par l'homme et constituent un bon modèle d'étude^{324,322}. Lorsque les souris $ApoE^{-/-}$ sont nourries par un régime alimentaire riche en graisse, le développement de leurs plaques est accéléré^{325,326,327}.

I. Production de PGE2 par la plaque d'athérosclérose

Dans la première partie de ma thèse, j'ai montré que la paroi artérielle produit de la PGE2 en réponse à un stimulus inflammatoire aigu et chronique. Ceci suggère que la plaque d'athérosclérose, foyer inflammatoire chronique, produit également de la PGE2. J'ai donc dosé la PGE2 tissulaire à partir de broyats d'aortes de souris $ApoE^{+/+}$ et $ApoE^{-/-}$.

Le contenu aortique basal en PGE2 détecté en l'absence de plaque chez les souris $ApoE^{+/+}$ (661 ± 98 pg/aorte, n=12) est significativement augmenté chez les souris $ApoE^{-/-}$ porteuses de plaques (2483 ± 485 pg/aorte, n=14, vs. $P < 0.05$) (**Figure II-8**). Cette quantité est encore plus élevée lorsque les souris $ApoE^{-/-}$ ont été soumises à un régime alimentaire riche en graisse (5018 ± 705 pg/aorte, n=23, $P < 0.001$) (**Figure II-8**). Il semble donc que la quantité de PGE2 soit directement corrélée à l'importance des plaques.

Pour étudier si la production de la PGE2 est fonction de la taille des plaques, j'ai analysé le contenu aortique en PGE2 en fonction du poids de l'aorte. Chez les souris sauvages, aucune corrélation n'apparaît ($r^2=0,35$) (**Figure II-8**). A l'inverse, le poids de l'aorte des souris $ApoE^{-/-}$ est directement corrélé avec le contenu en PGE2 de l'aorte ($r^2=0,82$) (**Figure II-8**). Comme le poids de l'aorte est lui-même corrélé à l'importance des plaques qui s'y sont développées³²⁸, l'on peut en déduire que la quantité de PGE2 est liée à l'importance des plaques d'athérosclérose. Donc, les plaques d'athérosclérose synthétisent la PGE2 en abondance.



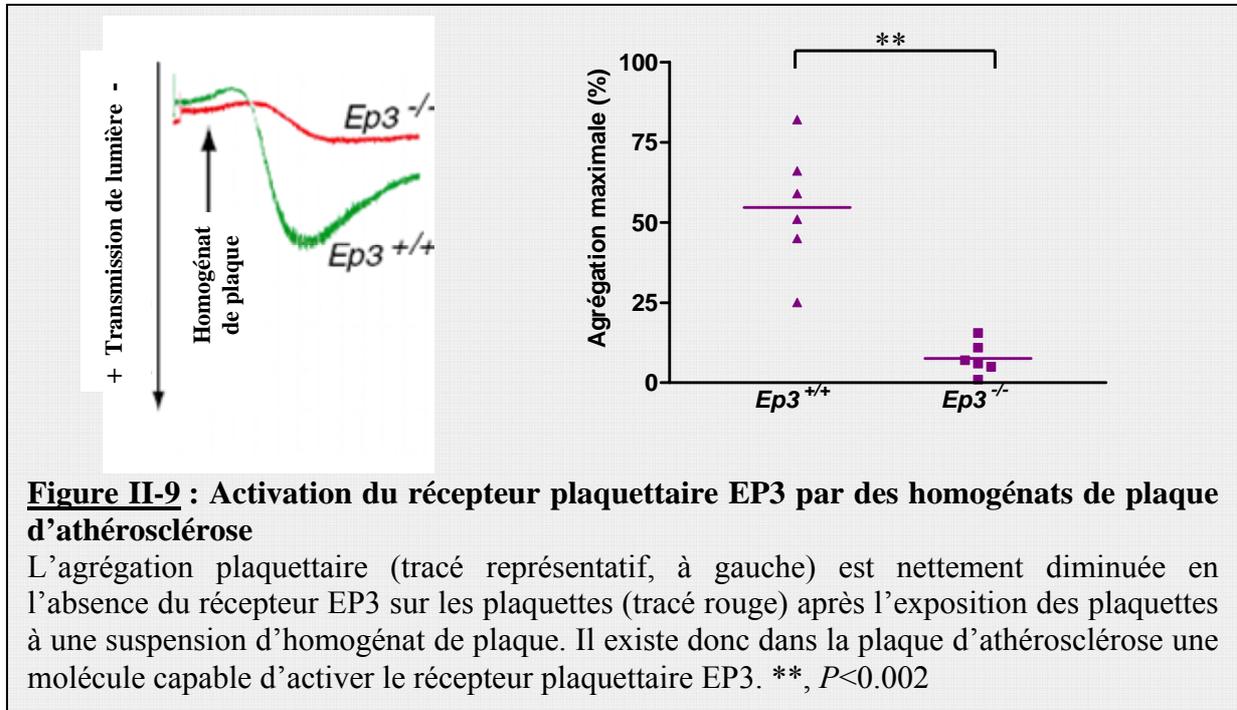
II. La PGE2 produite par la plaque est fonctionnelle.

1. Etudes *in vitro*

La plaque d'athérosclérose est un lieu hautement réactif où beaucoup de réactions oxydatives se produisent. Des ions superoxydes pourraient ainsi modifier la structure de la PGE2 et affecter sa fonctionnalité, notamment sa capacité à se lier à son récepteur EP3.

Des études antérieures^{286,298} ont montré que le broyat de plaque d'athérosclérose entraîne l'agrégation de plaquettes *in vitro*. J'ai repris leur idée pour tester la fonctionnalité de la PGE2 « intra-plaque ». Les concentrations élevées de broyat de plaques provoquent une agrégation immédiate et puissante qui est insensible à l'action de la PGE2 ; j'ai donc pris soin de déterminer les faibles concentrations de plaques qui me permettront de mettre en évidence une éventuelle facilitation de l'agrégation par la PGE2 intra-plaque. J'ai ensuite mis des suspensions de plaquettes de souris $Ep3^{+/+}$ ou $Ep3^{-/-}$ en présence de concentrations sous-maximales de broyats de plaque (0,5mg/mL). En présence du récepteur plaquettaire EP3, les plaquettes agrègent en réponse à la dose sous-maximale de broyats de plaque ($54,7 \pm 7,9$ % de l'agrégation maximale, $n=6$) (**Figure II-9**, tracé vert). A l'inverse, l'absence du récepteur EP3

au niveau des plaquettes diminue voire abolit l'agrégation plaquettaire induite par la même concentration d'homogénat de plaques ($7,6 \pm 2,1$ % de l'agrégation maximale, $n=6$, $P<0.002$) (**Figure II-9**, tracé rouge), et représente seulement 14% de l'agrégation obtenue avec les plaquettes $Ep3^{+/+}$.

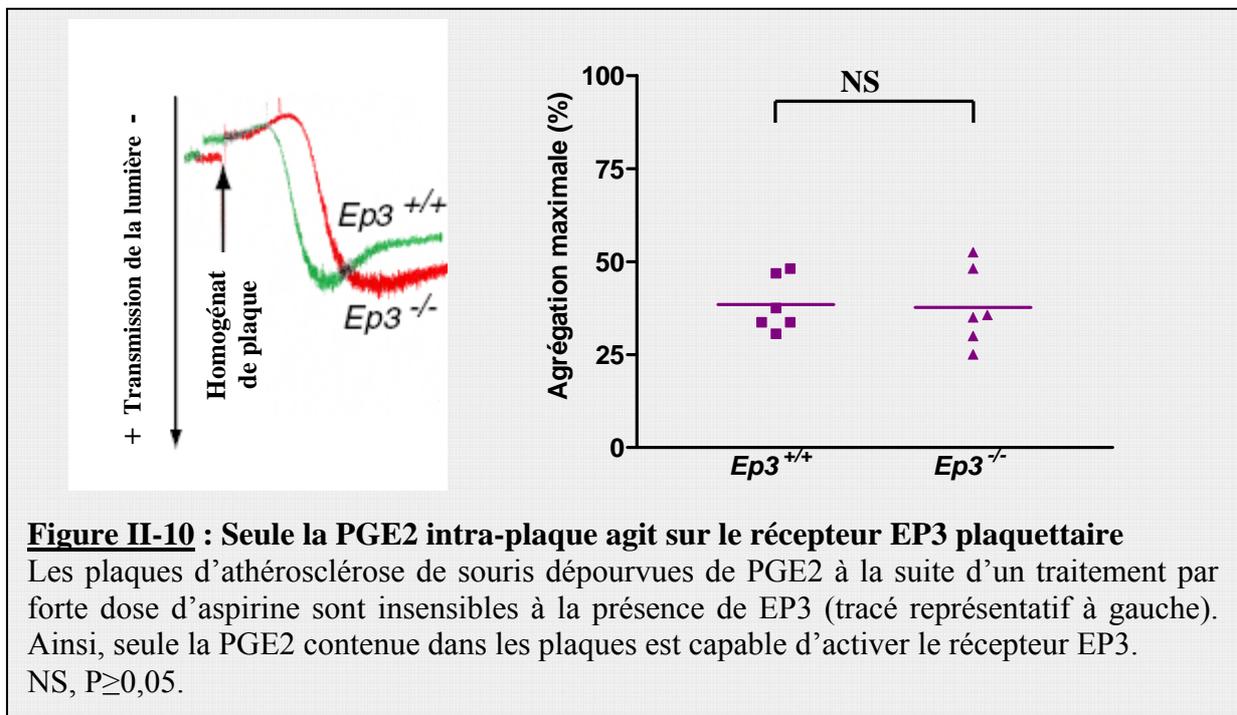


Donc, il existe dans les broyats de plaque une molécule qui active le récepteur plaquettaire EP3. Cette molécule est probablement la PGE2 mais la plaque est un milieu contenant d'autres molécules capables d'activer éventuellement le récepteur EP3. En effet, il a été montré par exemple que le récepteur EP2 peut être activé par certains lipides oxydés de la plaque, les oxPAPC, en plus de son ligand naturel, la PGE2²⁰⁰. Les oxPAPC, plus particulièrement leur composé PEIPC active la voie de transduction EP2-Gs-AMPC et participe aux interactions monocytes-cellules endothéliales en augmentant l'expression de la $\beta 1$ intégrine. J'ai donc cherché à mettre en évidence dans les plaques d'athérosclérose une autre substance que la PGE2 capable d'activer le récepteur EP3.

Pour cela, j'ai stoppé la production intra-plaque de PGE2 en inactivant irréversiblement les COX par l'administration de fortes doses d'aspirine (500mg/Kg/8jours en IP) à des souris $ApoE^{-/-}$. Le dosage tissulaire de la PGE2 des plaques de ces souris $ApoE^{-/-}$ a confirmé que le niveau de PGE2 n'est pas significativement différent de la valeur de base trouvée dans les

aortes de souris *ApoE*^{+/+} non traitées ($401,1 \pm 163,8$ pg/aorte, n=4 vs. 661 ± 98 pg/aorte, n=12).

S'il existe une autre molécule activant de façon non spécifique le récepteur EP3, l'homogénat des plaques devrait faciliter l'agrégation des plaquettes portant le récepteur EP3, mais pas les plaquettes dépourvues de EP3. Or l'agrégation induite par les broyats de plaque n'a pas été influencée par l'absence du récepteur plaquettaire EP3 ($38,4 \pm 3,0$ %, n=6 vs. $37,7 \pm 4,3$ % de l'agrégation maximale, n=6, P = NS) (**Figure II-10**). Donc, il n'existe pas de molécule autre que la PGE2, produit par les plaques et qui soit capable d'activer le récepteur plaquettaire EP3. L'activation du récepteur EP3 est due à la seule PGE2 intra-plaque.



En conclusion, les plaques d'athérosclérose produisent une importante quantité de PGE2 qui reste fonctionnelle au sein des plaques. Cela suggère que la PGE2 intra-plaque facilite l'athéro-thrombose, mais ce résultat a été obtenu *in vitro*.

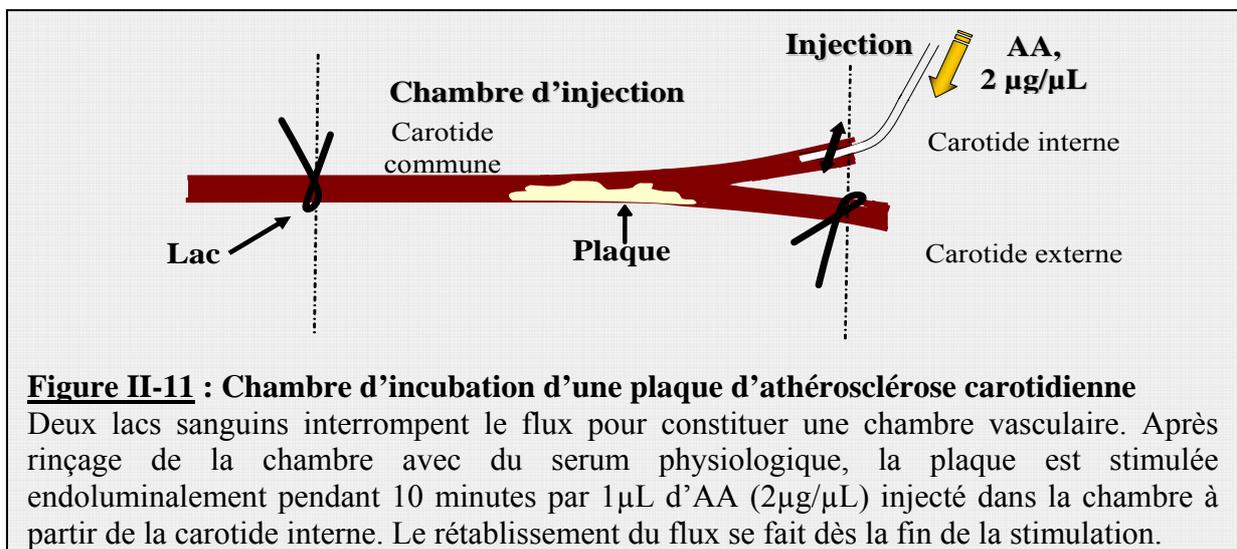
Il faut maintenant montrer que la PGE2 produite à l'intérieur de la plaque puisse réellement atteindre la région sous-endothéliale sans être modifiée pour pouvoir agir sur les plaquettes.

2. Etude in vivo

Pour pouvoir faciliter l'agrégation plaquettaire la PGE2 intra-plaque doit encore être fonctionnelle quand elle vient au contact des plaquettes sanguines. Pour tester ce point, j'ai forcé la plaque à produire les métabolites de l'AA et donc à produire de la PGE2, en espérant que l'exposition de la plaque à l'AA entraîne une thrombose locale, qui serait alors probablement due à l'activation des plaquettes par le TXA2. Si l'étendue de cette thrombose dépend de la présence de EP3 sur les plaquettes, alors je pourrai conclure que la PGE2 produite par la plaque a facilité l'athéromatose. Cela montrerait aussi indirectement que la PGE2 intra-plaque a atteint les plaquettes tout en restant fonctionnelle.

a. Procédure

Pour forcer la plaque à produire de la PGE2, j'ai mis au point un système de chambre de perfusion au niveau des artères carotidiennes qui permet d'interrompre provisoirement le flux sanguin et d'exposer la plaque à une solution contenant la molécule à délivrer. Cette chambre d'injection est obtenue par la mise en place de lacs au niveau de la carotide commune (en amont de la plaque) et des carotides interne et externe (en aval de la plaque). Une seringue équipée d'une aiguille adaptée est introduite dans la carotide interne pour rincer la chambre vasculaire avec du sérum physiologique avant de stimuler la surface de la plaque avec de l'AA pendant 10 minutes (**Figure II-11**). Une fois la stimulation terminée, la carotide interne est ligaturée et les lacs sont enlevés pour rétablir la circulation du flux sanguin, de la carotide commune vers la carotide externe.



J'ai effectué des tests préliminaires pour déterminer la concentration d'AA qui respecte la paroi saine, c'est-à-dire qui ne provoque pas de thrombose à son contact. Le pari était alors que cette dose serait suffisante pour stimuler la plaque et provoquer une thrombose à son contact, puisqu'elle contient plus de macrophages que la paroi normale.

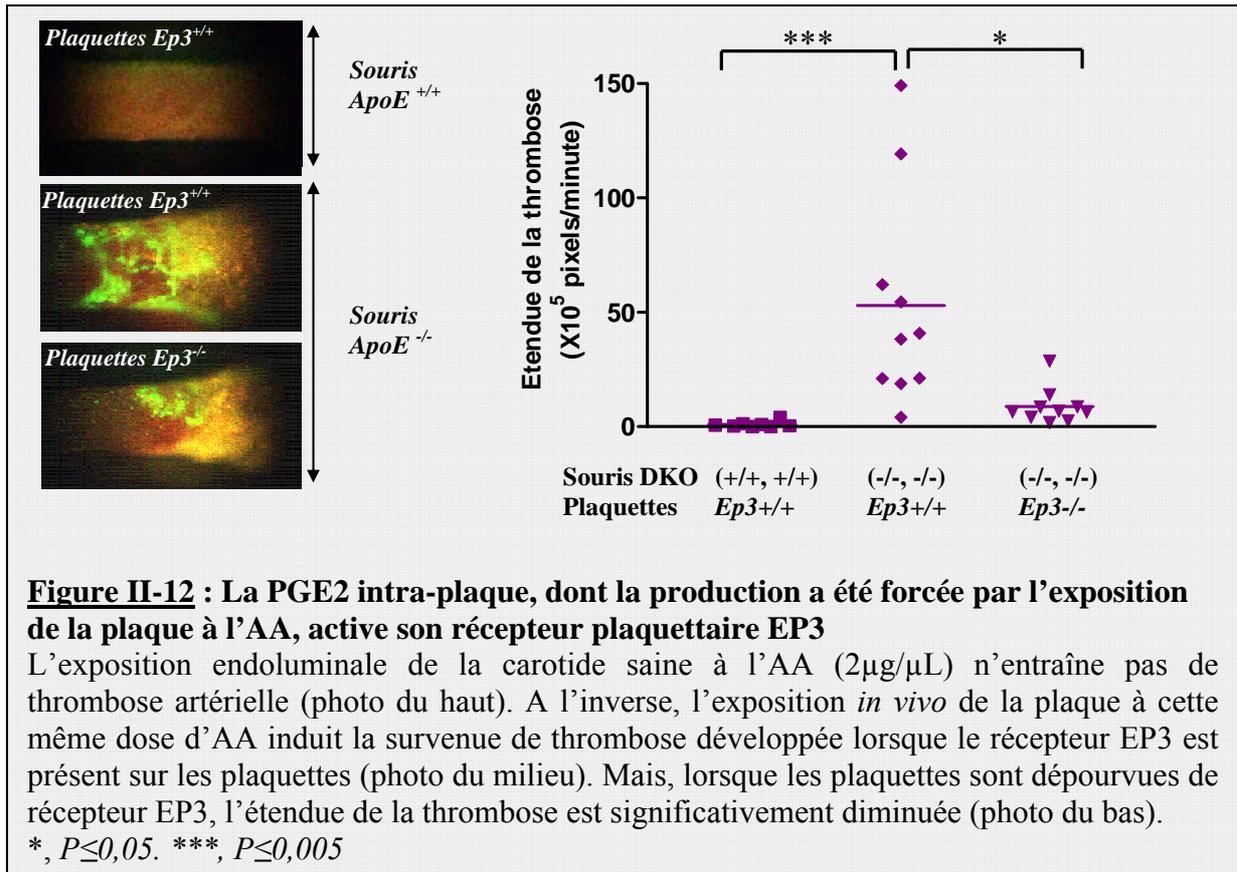
Ainsi, après avoir testé différentes doses faibles d'AA, j'ai trouvé que la dose endoluminale maximale respectant la paroi saine est de $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (**Figure II-12** photo « plaquettes $EP3^{+/+}$ » en haut à gauche ; $0,94 \times 10^6$ pixels/minute, $n=8$, **Figure II-12**). A l'inverse, l'exposition endoluminale de la plaque à cette même dose d'AA provoque l'apparition d'une thrombose artérielle à son contact après le rétablissement du flux sanguin (**Figure II-12**, photo du milieu à gauche). J'avais donc mis au point un modèle d' « athérombose provoquée ».

Sous le microscope fluorescent muni d'un filtre à double bande, il est aisé d'observer la thrombose artérielle (détection en vert des plaquettes chargées en calcéïne) qui se développe sur la plaque d'athérosclérose (détectée en jaune orangé, due à son autofluorescence).

b. Résultats

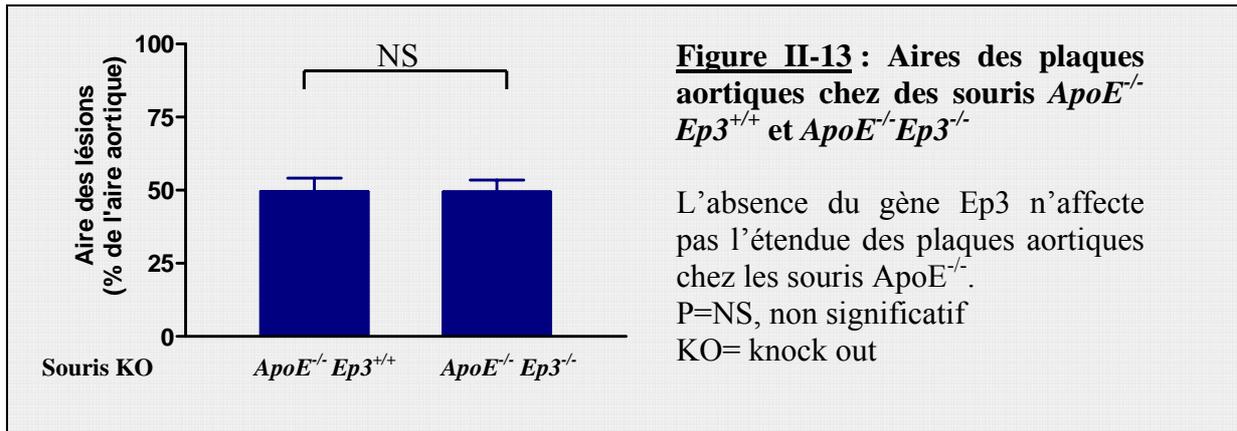
Pour examiner si la PGE2 intra-plaque influence cette athérombose provoquée, j'ai utilisé des souris ($ApoE^{-/-}, Ep3^{-/-}$) (DKO), ayant reçu des plaquettes fluorescentes $Ep3^{+/+}$ ou $Ep3^{-/-}$. J'ai utilisé les DKO pour éviter que les plaquettes natives exprimant le récepteur EP3 des souris $ApoE^{-/-} EP3^{+/+}$ ne recrutent les plaquettes fluorescentes et déficientes pour le récepteur EP3, augmentant artificiellement l'importance de la thrombose. Les plaquettes natives des souris DKO n'exprimant pas le récepteur EP3 ne seront donc pas activées par le couple PGE2-TXA2 de la plaque et ne recruteront donc pas des plaquettes fluorescentes. Ainsi, cette lignée de souris permet de tester si la PGE2 dont la production est forcée dans la plaque atteint les plaquettes en étant fonctionnelle.

L'administration endoluminale d'AA ($2\mu\text{g}/\mu\text{L}$) au niveau de plaques de souris DKO injectées de plaquettes fluorescentes $Ep3^{+/+}$ induit une thrombose artérielle évolutive ($52,9 \pm 14,8 \times 10^6$ pixels/minute, $n=10$, **Figure II-12** photo du milieu et graphe). Lorsque les souris DKO sont injectées avec des plaquettes fluorescentes $Ep3^{-/-}$, l'étendue de la thrombose artérielle détectée à la surface de leur plaque est significativement diminuée ($8,7 \pm 2,5 \times 10^6$ pixels/minute, $n=10$, $P \leq 0,05$, **Figure II-12** photo du bas et graphe). Cela suggère que la PGE2 produite par la plaque exposée à l'AA a été capable de sortir de la plaque pour activer son récepteur plaquettaire EP3.



Cependant, ce résultat ne permet pas de prévoir le rôle de la PGE2 en situation physiopathologique, pour les trois raisons suivantes :

1) j'ai travaillé sur des souris DKO, qui sont invalidées pour les gènes *ApoE* et *Ep3*. Or il n'est pas évident que l'absence de EP3 ne modifie pas le développement la plaque, quantitativement et qualitativement. Comparer les plaques de façon quantitative est faisable. Après prélèvement et dissection, j'ai coloré les aortes de souris *ApoE*^{-/-} vs. DKO avec du Noir Sudan, connu pour sa fixation aux graisses et donc aux plaques. L'aire des plaques a été quantifiée par le logiciel Adobe Photoshop et a été reportée à l'aire totale de l'aorte. L'aire occupée par les plaques aortiques chez les souris *ApoE*^{-/-} est similaire à celle occupée chez les souris DKO (49,3 ± 4,1 %, n = 10 vs 49,8 ± 5,1 % de l'aire aortique totale, n = 9, P=0,89) (**Figure II-13**). Cela montre que l'absence du gène *Ep3* ne modifie pas l'extension des plaques d'athérosclérose.



Par contre, la comparaison qualitative est a priori complexe (par exemple, la fonction des macrophages de la plaque est-elle modifiée par l'absence de EP3 ?), si bien qu'il est plus rapide d'examiner le rôle de la PGE2 dans un modèle plus proche de la réalité physiologique.

2) Ce modèle d'induction qui force la production de PGE2 ne nous permet pas de conclure que la PGE2 de la plaque joue un rôle pro-thrombogène dans l'athéromatose dans la mesure où la plaque n'est pas soumise à un stress physiopathologique dans mon modèle d'athéromatose forcée.

3) De plus, la plaque contient de nombreux autres agents influençant l'agrégation plaquettaire, comme le collagène²⁸⁶, le LpA²⁹⁸, les moxLDLs²⁹⁹ et le cholestérol sulfate³⁰¹. C'est une raison supplémentaire pour établir le rôle relatif de la PGE2 en physiopathologie, c'est à dire d'examiner si son rôle est suffisamment important pour moduler la thrombose provoquée par une rupture de la plaque.

En conclusion, la réduction de l'athéromatose induite par l'AA en absence de EP3 suggère que la PGE2 reste fonctionnelle dans la plaque *in vivo* et de plus qu'elle est capable de sortir de la plaque pour activer les plaquettes. Cependant, ce modèle ne permet pas de montrer que la PGE2 joue un rôle en physiopathologie. En utilisant un modèle de rupture de plaque, j'ai voulu répondre à cette question.

III. Rôle de la PGE2 dans l'athéromatose sur rupture de plaque

1. Modèles d'induction de rupture de plaque

Le concept actuellement accepté est que la rupture de la plaque entraîne la thrombose locale en exposant son contenu thrombogénique aux plaquettes. Mon but a alors été de mettre au point un modèle de rupture pour tester le rôle de la PGE2.

Bien que les souris *ApoE*^{-/-} sous régime alimentaire riche en graisse (6 mois ou plus) développent des ruptures spontanées de plaques³²⁹, ces ruptures sont tardives et imprévisibles. Différents modèles de rupture sont exposés dans la littérature : écrasement de la plaque entre deux pinces crantées³³⁰, induction de l'apoptose de cellules endothéliales entraînant une érosion de la plaque^{331,332}, ou modèle complexe de ligature suivie de mise en place d'un manchon³³³.

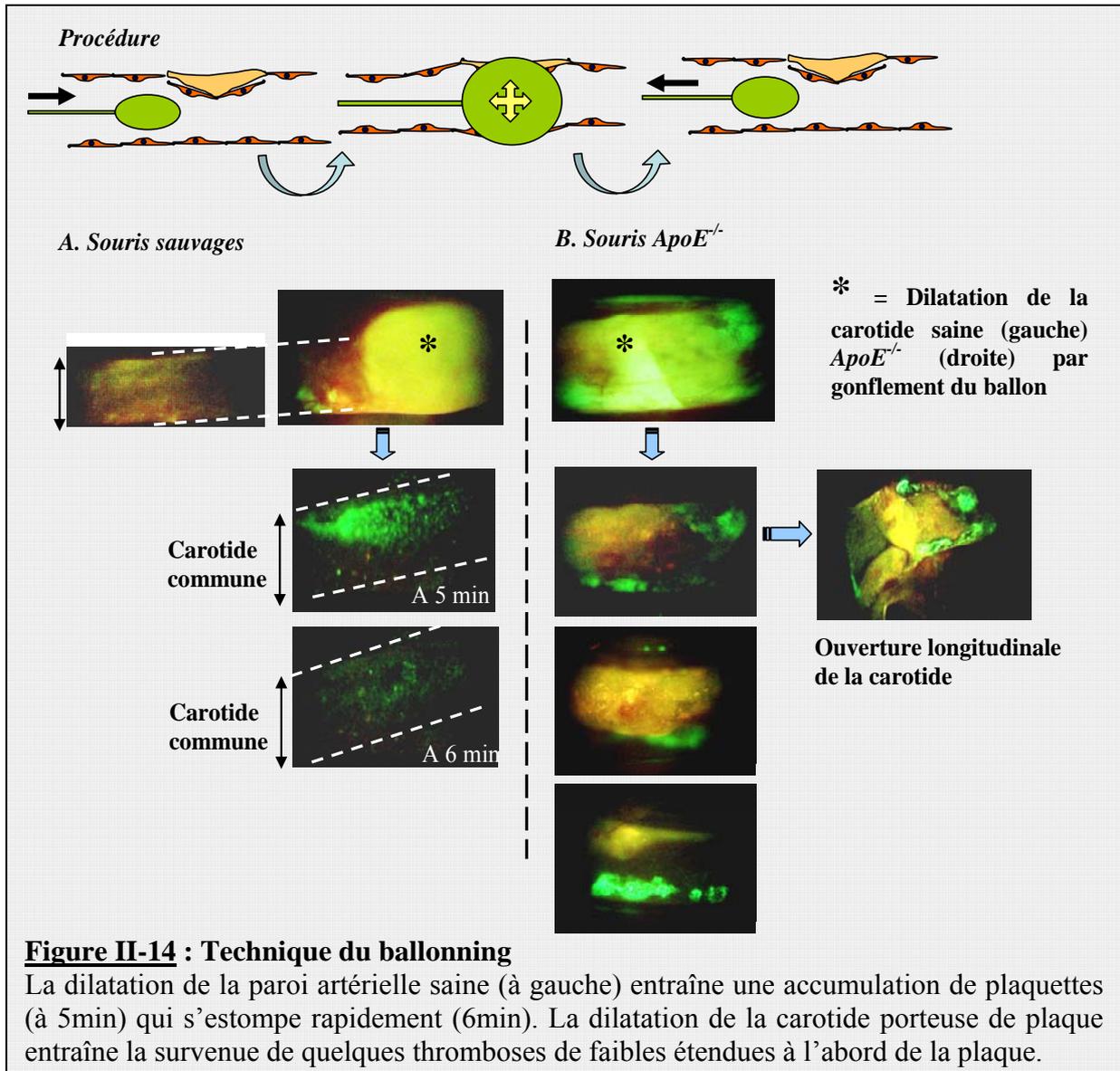
Nous avons décidé dans le laboratoire d'utiliser une technique de rupture qui soit aussi proche que possible de la situation clinique. J'ai donc mis au point la technique du ballonning chez la souris. Devant la constatation étonnante que l'écrasement de la plaque ne suffit pas à entraîner une thrombose intra-luminale, j'ai vérifié ce résultat en utilisant des techniques moins sophistiquées, comme l'écrasement par pince et la rupture *in situ* par grattage de la surface de la plaque.

a. Le ballonning

La technique du ballonning consiste à introduire un cathéter surmonté d'un ballon dans la carotide commune, à le placer en face d'une plaque d'athérosclérose et à dilater le ballon pour rompre la plaque. Le ballon étant rempli préalablement de calcéine, molécule fluorescente, la progression et la dilatation du ballon est sous contrôle de l'expérimentateur sous le microscope à fluorescence. Après la dilatation de la plaque, le ballon est retiré de l'artère et le flux rétabli (**Figure II-14**).

Chez les souris sauvages, la dilatation de la paroi saine a entraîné une accumulation de plaquettes qui s'estompe très rapidement avec le temps mais aucune vraie thrombose artérielle ne se développe, sans doute parce que la paroi souple ne se déchire pas (**Figure II-14**). A notre grande surprise, la dilatation prononcée et répétitive de la paroi porteuse de plaque d'athérosclérose n'a pas entraîné de thrombose importante. Les seuls thrombi détectés étaient localisés aux abords de la plaque (**Figure II-14**). Une explication possible est que cette

procédure n'est pas assez « violente » pour rompre réellement la plaque d'athérosclérose. C'est la raison pour laquelle nous avons alors essayé une méthode moins sophistiquée, mais plus radicale.

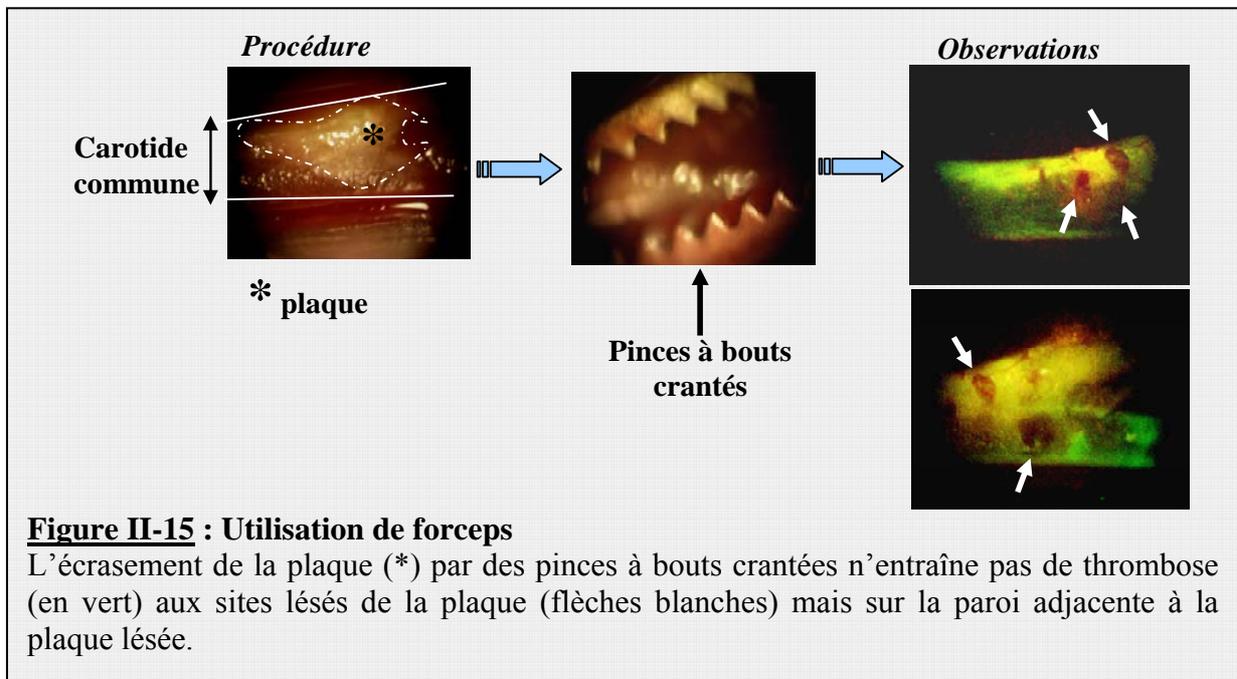


b. L'utilisation de pinces

Cette méthode consiste à écraser la plaque entre deux pinces à bouts crantés. Une fois la plaque rompue par cette procédure, les marques faites par les crans des pinces dans la plaque peuvent être observées (**Figure II-15**). La rupture de la plaque est donc évidente. Cette rupture entraîne une thrombose, mais réduite, parfois même inexistante et qui se développe à

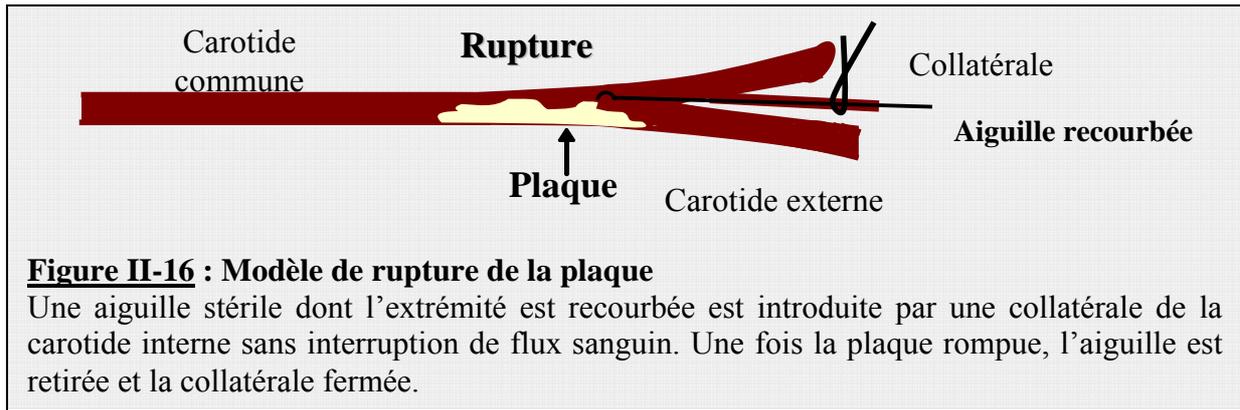
coté des fractures de la plaque (**Figure II-15**). Une étude utilisant cette procédure avait déjà rapporté que la paroi « saine » adjacente à la plaque est plus réactive, générant plus facilement une thrombose locale³³⁰. Nos données confirment ce point.

Non seulement cette méthode n'entraîne pas de thrombose massive, mais aussi et surtout elle n'est que peu contrôlable dans la mesure où la paroi saine adjacente est trop facilement lésée. D'où le risque trop important de détecter de la thrombose non liée à la plaque. De plus, l'incidence non négligeable d'hémorragie adventicielle interférait avec la détection du signal vert de la thrombose. J'ai donc préféré continuer mes essais en rompant directement la plaque *in situ*.

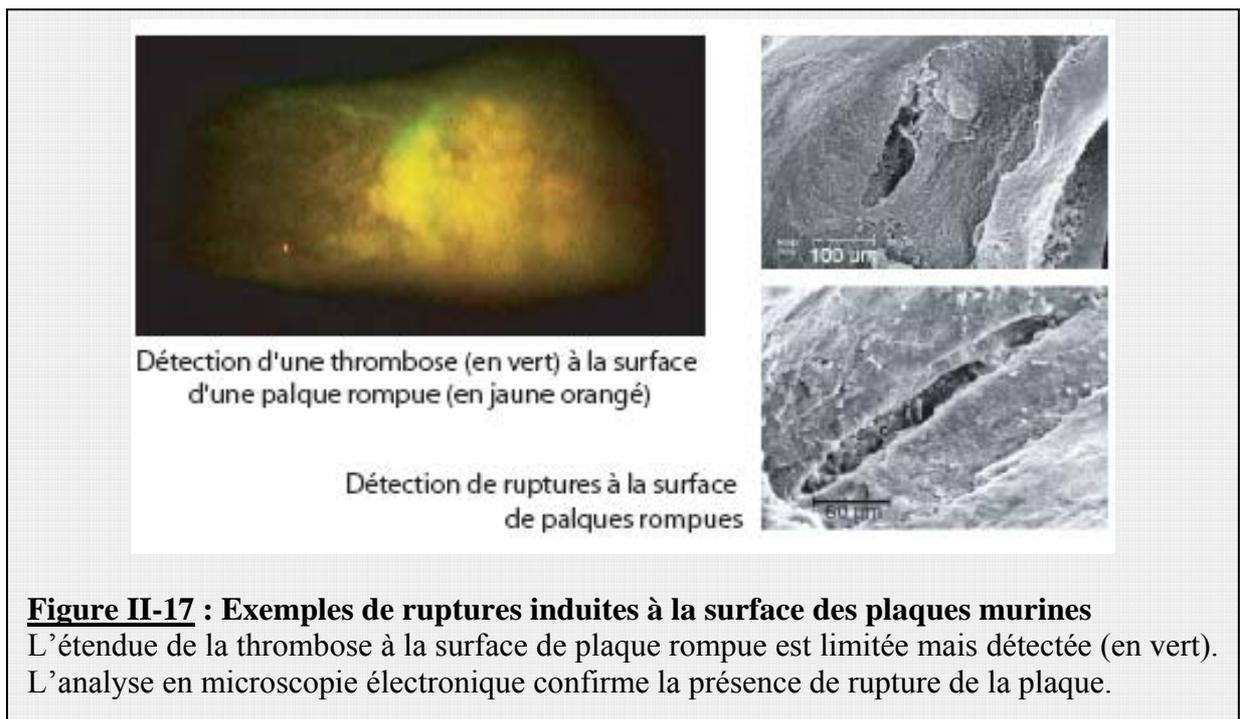


c. Constitution d'une lésion superficielle par griffure

Cette technique utilise une aiguille stérile et très fine dont l'extrémité est recourbée pour faciliter la griffure de la surface de la plaque. L'aiguille est introduite par une collatérale de la carotide interne ligaturée après la procédure (**Figure II-16**).



En réponse à la griffure restreint à la surface de la plaque, de petits thrombi sont détectés au contact de la plaque lésée (**Figure II-17**). Ces thromboses étaient réduites, jamais occlusives, mais elles peuvent cependant être quantifiées par notre système de détection. Ces thromboses sont bien conséquentes d'une rupture de plaque car la présence de rupture a été confirmée par l'observation en microscopie électronique de la surface des plaques lésées (**Figure II-17**).

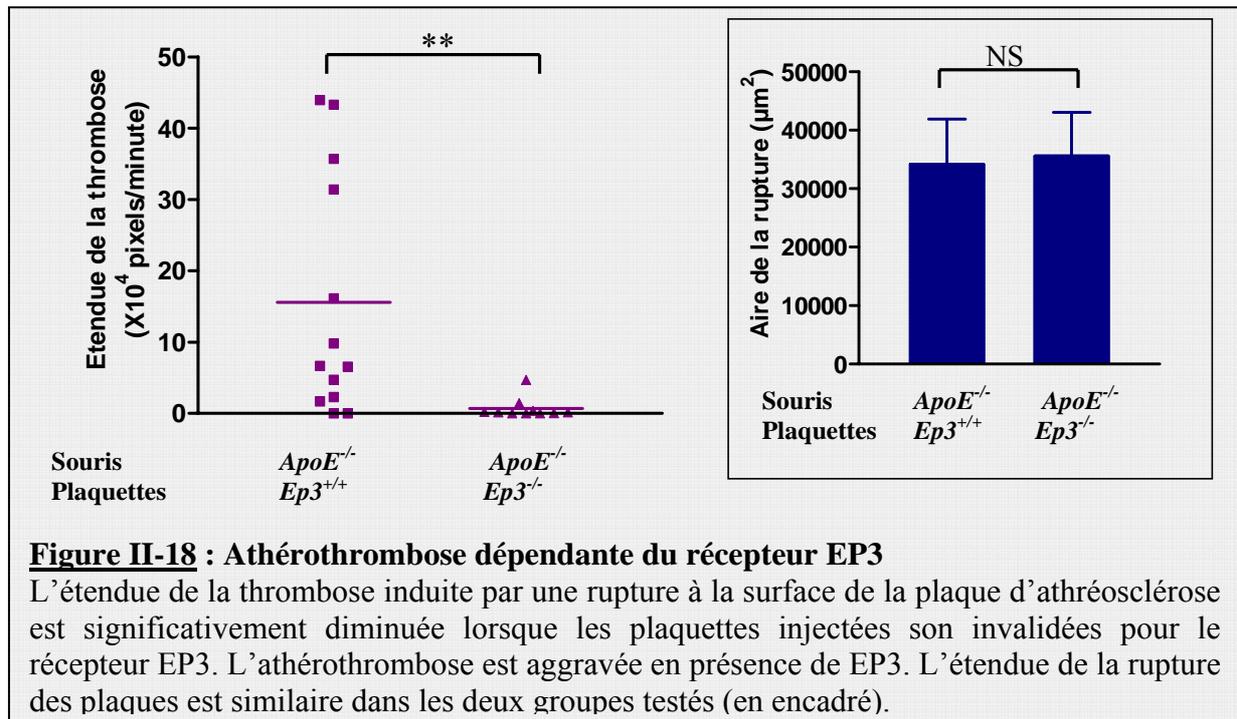


J'ai donc utilisé cette méthode pour déterminer si la PGE2 produite par la plaque facilite l'athéromatose sur rupture de plaque, et via son récepteur EP3.

2. La rupture de la plaque entraîne une thrombose EP3 dépendante

L'étendue de la thrombose détectée après un griffure de la plaque de souris *ApoE*^{-/-} injectées de plaquettes fluorescentes *Ep3*^{+/+} est variable ($15,6 \pm 4,7 \times 10^4$ pixels/minute, n=13, **Figure II-18**). Mais l'étendue de la thrombose chez des souris *ApoE*^{-/-} injectées de plaquettes fluorescentes *Ep3*^{-/-} est extrêmement réduite ($0,72 \pm 0,5 \times 10^4$ pixels/minute, n=10, P=0,008, **Figure II-18**). Ainsi, la rupture de la plaque entraîne une thrombose qui est dépendante de la présence du récepteur EP3 sur les plaquettes.

Comme le récepteur plaquettaire EP3 est spécifique de la PGE2 et que la plaque produit de la PGE2, la thrombose détectée à la surface des plaques est dépendante de la PGE2 provenant de la plaque, à condition qu'il n'y ait pas de biais dû à une différence dans l'extension de la rupture entre les deux groupes. L'analyse par microscopie électronique m'a permis de vérifier l'absence de ce biais. Les ruptures ne sont pas spécifiquement différentes entre les deux groupes ($34200 \pm 7691 \mu\text{m}^2$, n=13 vs. $35600 \pm 7454 \mu\text{m}^2$, n=10, P=0,89) (**Figure II-18**).



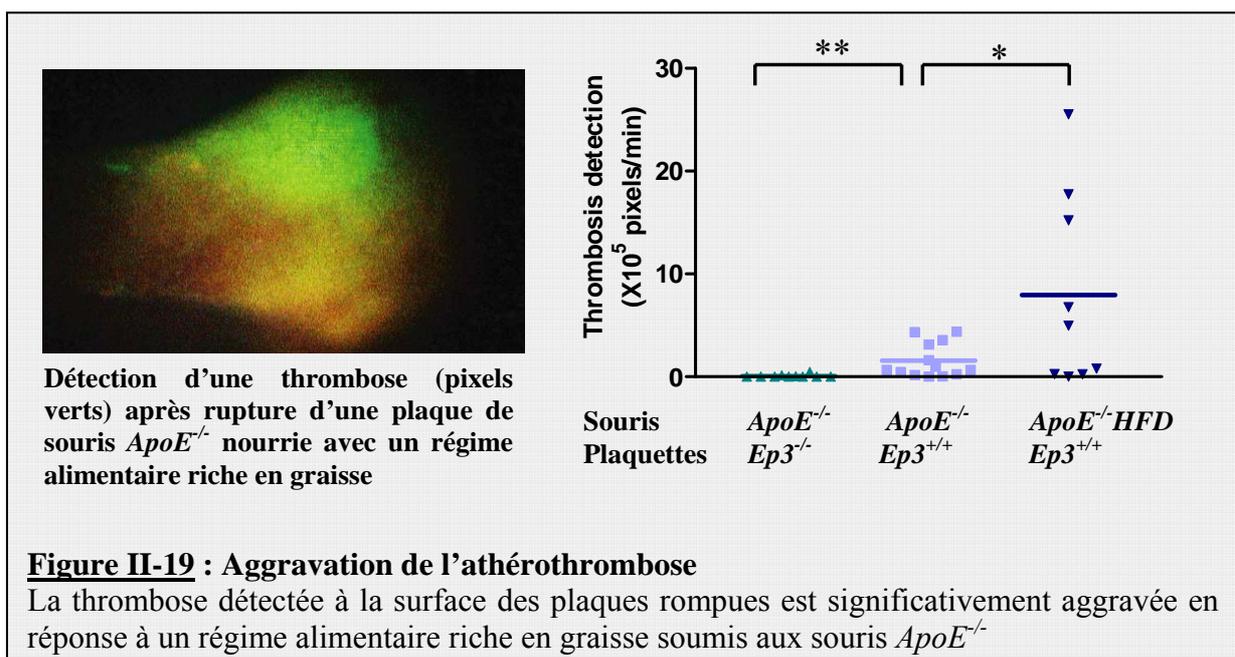
Dans ce modèle, l'étendue de l'athéromatose est minimale, et cela peut-être dû à l'état inflammatoire modéré de la plaque. Mais cette inflammation produit suffisamment de PGE2 pour faciliter l'action des agonistes exposés par la rupture de la plaque. Ainsi, à elle

seule, cette expérience proche des conditions physiopathologiques confirme tous les résultats précédemment montrés, à savoir que 1/ la plaque produit de la PGE2, 2/ que cette PGE2 reste fonctionnelle 3/ que cette PGE2 active son récepteur EP3 sur les plaquettes lumineales facilitant leur agrégation.

Par ailleurs, l'on sait que l'état inflammatoire des plaques peut varier et que la quantité de PGE2 est augmentée en réponse à l'inflammation. Cela suggère que plus une plaque est enflammée, plus elle va produire de la PGE2, et devrait ainsi amplifier l'athérombose.

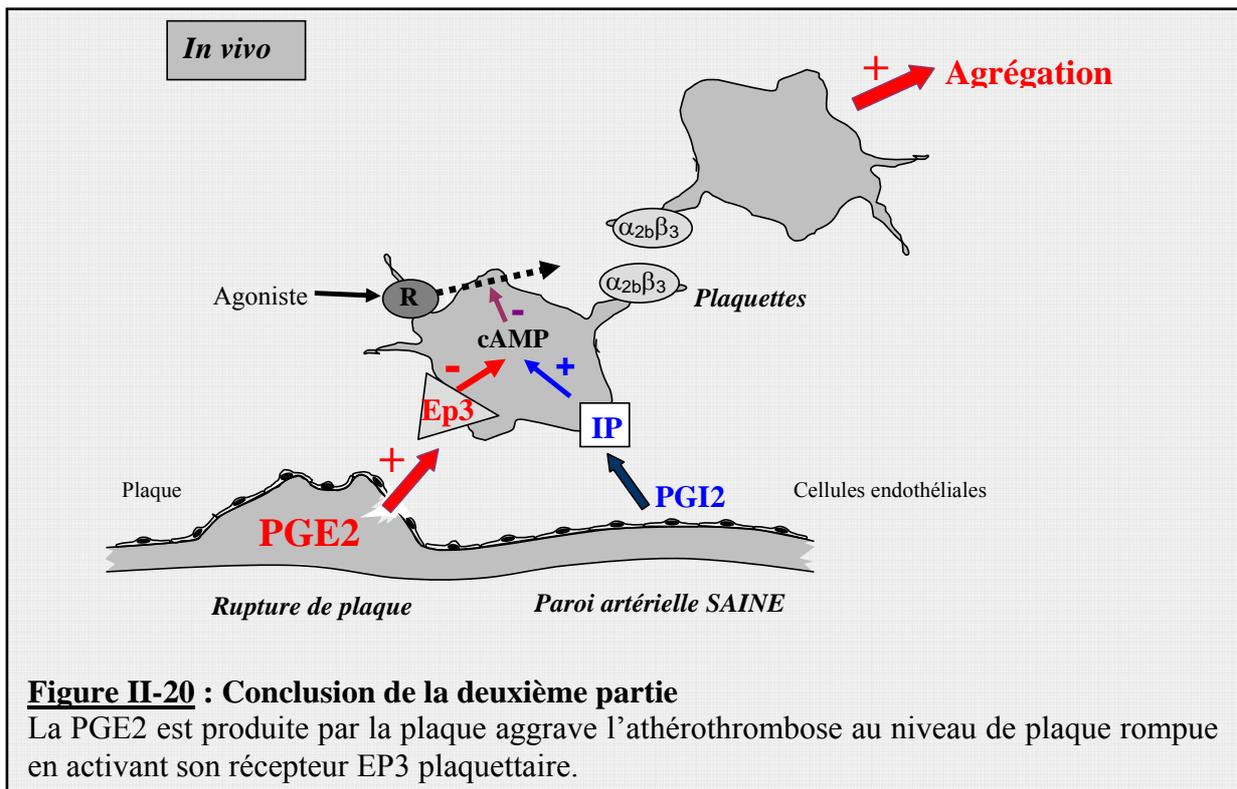
3. Effet de l'augmentation de la PGE2 intra-plaque sur l'athérombose

Dans le premier paragraphe de cette seconde partie, j'ai montré que les plaques de souris *ApoE*^{-/-} soumises à un régime hypercholestérolémiant synthétisent plus de PGE2 que les plaques de souris *ApoE*^{-/-} soumises à un régime alimentaire normal. Après avoir nourri pendant 5 semaines des souris *ApoE*^{-/-} avec un régime hypercholestérolémiant, j'ai rompu leurs plaques carotidiennes et ai évalué la thrombose sous-jacente après injection de plaquettes fluorescentes portant le récepteur EP3. L'étendue de la thrombose est significativement augmentée par rapport au groupe de souris *ApoE*^{-/-} soumises à un régime alimentaire normal ($7,94 \pm 3,12$, n=9 vs. $1,56 \pm 0,47$, n=13, $P_w=0,038$) (**Figure II-19**). Ainsi, cette expérience suggère que la quantité de PGE2 intra-plaque détermine la thrombogénicité de la plaque.



En conclusion, mes travaux ont permis de vérifier les hypothèses posées. La plaque produit de la PGE2, qui est fonctionnelle et qui est capable d'atteindre les plaquettes sanguines pour les sensibiliser aux agonistes libérés par la rupture de la plaque. Donc, la PGE2 aggrave l'athéromatose et joue un rôle important dans la thrombogénicité de la plaque (**Figure II-20**).

Donc, effectivement l'activation de la voie de l'AA produit un médiateur dans la plaque susceptible de moduler sa thrombogénicité.



PUBLICATION

**Vascular wall-produced prostaglandin E2 exacerbates
arterial thrombosis and atherothrombosis
through its EP3 receptor**

**Sabrina Gross, Peggy Tilly, Didier Hentsch,
Jean-Luc Vonesch, and Jean-Etienne Fabre.**

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, Illkirch, 67404,
C.U. de Strasbourg, France.

Condensed title : PGE2 aggravates atherothrombosis

Corresponding author: Jean-Etienne Fabre

IGBMC, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, F-67404 Illkirch Cedex, France

Phone: (001) 3-88-653385; Fax: (001) 3-88-653201

E-mail: jefabre@igbmc.u-strasbg.fr

Total character count (not counting spaces) : 40180

Non-standard abbreviations : Arachidonic acid : AA; Cyclooxygane : COX ; Prostaglandin E2 : PGE2;
Prostacyclin : PGI2; Thromboxane A2 : TXA2; Nitric Oxide : NO.

Abstract

Prostanoids, bioactive lipids derived from arachidonic acid (AA), are important for vascular homeostasis. Among them, prostaglandin E2 (PGE2) enhances aggregation of platelets sub-maximally stimulated *in vitro*. This results from activation of EP3, one of the four PGE2 receptors, which decreases the threshold at which agonists activate platelets to aggregate. Although PGE2 altered venous thrombosis induced by administration of AA, its role in physiopathological conditions has remained speculative. We report here that arterial wall subjected to inflammatory stimuli produces PGE2. In several models, we show that PGE2 produced by the arterial wall facilitates arterial thrombosis. Next, we detected PGE2 in murine atherosclerotic plaques. We demonstrate that this plaque-produced PGE2 is not altered and is still able to activate EP3. In addition, we present evidences that PGE2 can leave the plaque and activate EP3 on blood platelets. Consistent with these findings, we observed that atherothrombosis induced *in vivo* by mechanical rupture of the plaque was drastically decreased when platelets lacked EP3. In conclusion, PGE2 facilitates the initiation of arterial thrombosis and hence contributes to atherothrombosis. Inhibition of its platelet EP3 receptor should improve prevention of atherothrombosis.

Introduction

Atherosclerosis is an inflammatory disease and thickens the intimal part of the arterial wall by focal plaques, which are confined by a fibrous cap and covered with the endothelial layer (1;2). Atherothrombosis is the occurrence of thrombosis on the surface of these plaques. This major complication is induced by either a mere denudation of the endothelium, also called endothelial erosion, or a frank rupture of the fibrous cap. The endothelial erosion exposes subendothelial collagen, releases von Willebrand factor and promotes platelet aggregation. In addition to these mechanisms, the rupture releases tissue factor contained in the lipid core (3), and activates the coagulation pathway which increases the thrombogenic stimulus. However, a superficial erosion may trigger massive thrombosis (4;5) while a rupture may induce only limited thrombosis (6). Therefore, the resulting thrombotic response must be influenced by other factors such as the platelet aggregability, which might play a pivotal role in regulating the response to stimuli.

The chronic inflammatory condition prevailing in the plaque explains the presence of numerous macrophages and the activation of their phospholipase A2 which releases AA from membrane phospholipid pools. Cyclooxygenases (COXs) and particularly COX-2 are expressed in plaques (7;8) and convert AA into the cyclic endoperoxide PGH₂. The structure of PGH₂ is then rearranged by specific enzymes to yield several prostanoids, such as thromboxane A₂ (TXA₂), prostacyclin (PGI₂) or PGE₂, depending on the tissue considered. In the plaque, PGH₂ is thought to be preferentially converted into PGE₂. This is consistent with *in vitro* preferential production of PGE₂ by sustained stimulation of macrophages (9;10) and with identification in the plaque of mPGES-1 which converts PGH₂ into PGE₂ (8;11). Indeed, dissected murine *ApoE*^{-/-} aorta surviving in culture media were shown to produce PGE₂ (12).

In vitro, PGE₂ by itself does not induce aggregation of platelets, but modulates the response to their agonists. High levels of PGE₂ (>10⁻⁵M) inhibit platelet aggregation through non-specific activation of

IP, the receptor for PGI₂, whereas low levels (<10⁻⁶M) increase aggregation of sub-maximally stimulated platelets (13;14), an effect named potentiation. The specific actions of PGE₂ are mediated through binding to four different G protein-coupled heptahelical receptors, EP1, EP2, EP3 and EP4 (15). EP2, EP3 and EP4 mRNAs have been identified in murine platelets, where EP3 expression predominates largely (16). Studies of mice selectively lacking each of the four known EP receptors have evidenced that the potentiating effect of PGE₂ is mediated solely by EP3 (14). Activation of EP3 on platelets inhibits adenylate cyclase, decreases the cAMP intracellular level (14;16), and decreases the platelet threshold of activation (14), which explains the potentiating effect. Briefly, low concentrations of PGE₂ *in vitro* activate its EP3 receptor on platelets and increase their sensitivity to agonists, leading to full aggregation even when they are sub-maximally stimulated.

In vivo significance of the PGE₂-induced potentiation of platelet aggregation observed *in vitro* requires that inflammation produces PGE₂ in the low range in order to activate specifically the EP3 receptor, not the IP receptor. We and others (14;16) have shown that mice lacking EP3 developed less severe thrombosis after exogenous AA was delivered in the venous bed. These data indicate that although its precursor was supplied in abundance, PGE₂ was not produced at inhibiting concentrations, but instead increased the aggregation induced by TXA₂ (14), a potent agonist of platelets.

We therefore hypothesized that PGE₂ enhances atherothrombosis. To test our hypothesis, we first examined whether PGE₂ can modify the haemostatic balance in arterial flow, since it is a highly inhibitory environment for platelet aggregation. We found that PGE₂ is produced by the arterial wall in response to inflammation and, using EP3-deficient mice, that PGE₂ facilitates local arterial thrombosis. We have detected PGE₂ in murine plaques and we demonstrate that the plaque-produced PGE₂ enhances atherothrombosis induced by mechanical rupture of the plaque.

Results

The healthy arterial wall produces PGE2 in response to inflammation.

Using immunoassay techniques, we first examined whether the arterial wall can produce PGE2. We observed that the PGE2 content of healthy carotid wall (72 ± 9 pg per carotid, $n=15$) increased significantly after we topically applied 50 mg/ml AA onto the adventitia (317 ± 34 pg per carotid, $n=13$, $P<0.0001$, Fig. 1A). Thus, the arterial wall can convert AA into PGE2. To test the production of PGE2 by arterial tissue in more pathophysiological conditions, we placed a collar loosely maintained around the carotid for three weeks. This procedure known to locally induce a chronic inflammatory lesion (17) enhanced dramatically the tissue content of PGE2 (1330 ± 141 , $n=16$ versus 61 ± 8 pg per carotid, $n=6$ in control group, $P<0.0001$, Fig. 1A). These data show that inflammation stimulates the arterial wall to produce PGE2.

PGE2 modulates arterial thrombosis induced by topical delivery of AA.

Endothelium produces potent inhibitors of platelet aggregation, such as PGI2 or nitric oxide (NO) to prevent any inappropriate local thrombosis. To test whether PGE2 produced by arterial wall can oppose PGI2 and NO to alter the local arterial haemostatic balance, we adapted a previously described model of inflammatory venous thrombosis (14). Topical superfusion of 100 mg/ml AA onto the murine carotid induced intra-arterial thrombosis. This thrombosis was triggered by TXA2, since the visual semi-quantitative thrombotic score (18) dropped from 2.62 ± 0.32 ($n=8$) in WT mice to 0.01 ± 0.01 ($n=8$, $P<0.0001$) in mice lacking TP, the receptor for TXA2. Hence peri-adventitial delivery of AA leads to its conversion into both TXA2 and PGE2 by the arterial wall. To examine whether the TXA2-induced thrombosis is modulated by PGE2 in this model, we quantified the extent of thrombosis in mice deficient for EP3. After the mice were injected with fluorescently labeled platelets, the whole clotting

process was measured by counting the number of green fluorescent pixels on images acquired through a fluorescence microscope (Fig. 1B). The extent of arterial thrombosis measured in absence of EP3 ($29.5 \pm 7.0 \times 10^6$ pixels/min, $n=13$) was significantly reduced compared to WT mice ($57.4 \pm 6.2 \times 10^6$ pixels/min, $n=18$, $P=0.006$, Fig. 1C). Thus PGE2 produced by local peri-adventitial delivery of AA facilitated arterial thrombosis induced by TXA2 (movie A), and therefore successfully opposed PGI2 and NO to shift the haemostatic balance toward a pro-thrombotic state.

PGE2 modulates arterial thrombosis induced by topical delivery of ferric chloride.

Since its conversion by cyclo-oxygenases leads to PGE2 biosynthesis, the local delivery of AA to the arterial wall might have enforced PGE2 production and exaggerated its role in thrombosis formation. To test whether endothelial injury induced by inflammation produces enough PGE2 to alter local haemostasis, we topically applied ferric chloride (5%) onto the carotid. After its delivery, ferric chloride crosses the arterial wall and triggers thrombosis by inducing endothelial cells death, subsequent release of ADP and exposure of underlying collagen (19). Here, fluorescent thrombosis appeared about 8 min after ferric chloride application. It reached $12.7 \pm 3.3 \times 10^6$ pixels/min ($n=11$) in WT mice, but was significantly reduced to $2.2 \pm 1.0 \times 10^6$ pixels/min ($n=8$, $P=0.011$, Fig. 1D) in mice lacking EP3. These results show that PGE2 produced in response to aggression of the arterial wall is sufficient to facilitate platelet activation induced by ADP and/or collagen in arterial flow.

The mechanism of PGE2-induced facilitation of thrombosis.

PGE2 facilitates thrombosis by decreasing the activation threshold of platelets, making them more sensitive to their agonists (14). *In vivo*, PGE2 is produced by the arterial wall, but maybe also by activated platelets themselves (20). In the latter case, PGE2 might facilitate the effect of ADP and

TXA2 secreted by activated platelets to recruit more platelets. This would suggest that PGE2 plays a role in thrombosis amplification rather than in thrombosis driven by inflammation of the vascular wall. To address this possibility, we examined whether *in vitro* aggregation of isolated platelets is EP3-dependent. Platelets stimulated with low concentrations of collagen elicited partial aggregation that was not modified by the presence or the absence of EP3 (respectively $47.6\pm 2.1\%$ vs. $47.9\pm 4.2\%$, $n=4$ at $1.5\ \mu\text{g/ml}$ collagen, $P=0.95$ and $58.8\pm 4.2\%$ vs. $57.2\pm 3.0\%$, $n=9$ at $2\ \mu\text{g/ml}$ collagen, $P=0.75$, Fig. 2). The absence of potentiation shows that even if platelets secreted PGE2 upon their activation, the production was not sufficient to activate EP3 on resting platelets and could not amplify aggregation *in vitro*.

To further ascertain that platelet production of PGE2 does not alter aggregation *in vivo*, we looked for a model of thrombosis in which mural PGE2 is not produced when thrombosis starts. We tested a model of endothelial injury induced by oxidative stress resulting from local excitation of Rose bengal by a laser beam. Under standard conditions (21), we observed that a few clots were already visible at 4s, and that 80% of the arterial diameter was visually obstructed at 45s (Fig. 3A). PGE2 levels in these injured carotids were found in the range of control values, and were not significantly different between 4s (55 ± 6 pg per carotid, $n=6$) and 45s (73 ± 11 pg per carotid, $n=6$, $P>0.05$, Fig. 3B). Thus, we used this model deprived of PGE2 at the initiation of thrombosis to examine whether aggregating platelets could produce enough PGE2 to alter amplification of thrombosis. Consistent with our *in vitro* data, carotids of *Ep3*^{-/-} mice infused with EP3-deficient platelets were totally occluded after 30-min of laser exposure, as were WT mice ($n=5$ in each group). We concluded that platelets did not produce enough PGE2 *in vivo* to facilitate amplification. Altogether, our data show that thrombosis is facilitated primarily by arterial wall-produced PGE2.

Murine atherosclerotic plaques contain PGE2.

To further substantiate its role in pathophysiological conditions, we examined whether PGE2 modulates thrombosis on atherosclerotic plaques. To confirm previous data that suggested the plaque ability to produce PGE2 (8;12), we quantified it directly in murine plaques. While *ApoE*^{+/+} aorta contains 661±98 pg (*n*=12) of PGE2, its amount in *ApoE*^{-/-} aorta was found to be about four-fold higher, at 2483±485 pg (*n*=14, *P*<0.05). After we fed *ApoE*^{-/-} mice a high fat diet, which is known to increase the size of atherosclerotic lesions, the difference was even more impressive (5018±705 pg per aorta, *n*=23, *P*<0.001, Fig 4A). Thus atherosclerotic plaques produce PGE2.

Plaque-produced PGE2 is functional, able to activate EP3 on platelets in vitro.

Since numerous macrophages are recruited in the plaque (22;23) and produce reactive oxygen species (24), we examined whether PGE2 produced by the plaque was functionally altered. Homogenates of whole atherosclerotic plaques added to platelet suspension *in vitro* trigger their aggregation, as a consequence of their high content of collagen (25). We observed that low concentrations of homogenized plaques added to EP3-deficient platelets induced aggregation that reached only 14.6±3.0% (*n*=6 experiments) of WT platelet aggregations (*n*=6, Fig. 4B). We concluded that murine atherosclerotic plaques contain a molecule able to activate EP3. To rule out that another molecule than PGE2 could activate EP3 (26), we treated mice with high doses of aspirin (500 mg/Kg for 8 days) in order to inhibit cyclo-oxygenases. As expected, the treatment depressed the PGE2 levels in plaques (401.1±163.8 pg per aorta, *n*=4) down to the range of *ApoE*^{+/+} aorta values. Aggregation elicited by EP3 deficient platelets in response to homogenized suspensions of these aspirin-treated plaques reached 101.0±15.1% of the aggregation elicited by WT platelets (Fig. 4C). Thus the EP3 receptor was

not activated when PGE2 production is inhibited, indicating that the potentiating effect of homogenized plaques was indeed due to PGE2. Hence PGE2 produced by atherosclerotic plaques can activate EP3.

PGE2 contained in atherosclerotic plaques activates EP3 on blood platelets.

We then wondered whether PGE2 can exit from the plaque to act efficiently on blood platelets. To address the question, we enforced the plaque-production of PGE2 by exposing its endoluminal side to low concentrations of AA (2 mg/ml, Fig. 5A). We observed thrombi forming spontaneously when blood flow returned after the plaque has been incubated with AA (Fig. 5B, lower panels). Importantly, thrombosis was detected only at the contact of the plaque, indicating that the plaque produced a platelet agonist which triggered local aggregation. Conversely, healthy arterial wall was left unchanged by AA incubation, showing that the chosen dose of AA was too low to induce thrombosis at its contact (Fig 5B, upper panel). We then examined whether the plaque-produced PGE2 could modulate the local thrombosis elicited by the plaque, using *Ep3*^{-/-} mice crossed with *ApoE*^{-/-} mice. In these older than 55 weeks double mutant mice (*ApoE*^{-/-} x *Ep3*^{-/-}), the lack of EP3 did not alter the extent of atherosclerosis since their plaques covered 49.3±4.1% (*n*=10) of the total aortic surface versus 49.8±5.1 % (*n*=9, *P*=0.94) in (*ApoE*^{-/-} x *Ep3*^{+/+}) controls. The extent of thrombosis induced by intraluminal AA delivery reached 5.3±1.5 x10⁶ pixels/min (*n*=10) in presence of WT platelets, but was drastically reduced to 0.9±0.2 x10⁶ pixels/min (*n*=10, *P*<0.05) when injected fluorescent platelets lacked EP3 (Fig. 5C, movie B). This experiment shows that AA-induced atherothrombosis in these mice was modulated by PGE2, which indicates that the plaque-produced PGE2 was able to act on blood platelets through EP3.

Plaque-produced PGE2 promotes atherothrombosis induced by rupture of the plaque.

In the last step, we tested the role of PGE2 in pathophysiological conditions. Rupture of the fibrous cap allows blood platelets to be activated by their agonists present inside the lesion, such as collagen (25), lysophosphatidic acid (27), or tissue factor (28) that generates thrombin. We therefore examined whether a mere rupture of the plaque, the most frequent cause of myocardial infarction in human pathology, could induce atherothrombosis. After a tiny curved needle was introduced through a collateral of internal carotid and scratched the plaque (Fig. 6A-B), we observed small, non-occluding, however detectable thrombosis on the surface of the ruptured plaque. Although ruptured area measured by scanning electronic microscopy were similar in both groups of mice ($34200 \pm 7691 \mu\text{m}^2$, $n=13$ vs. $35600 \pm 7454 \mu\text{m}^2$, $n=10$, respectively, $P=0.89$), we observed an impressive reduction in the development of thrombosis according to the presence ($0.16 \pm 0.05 \times 10^6$ pixels/min, $n=13$) or absence ($0.007 \pm 0.005 \times 10^6$ pixels/min, $n=10$, $P=0.008$) of EP3 on platelets injected in *ApoE*^{-/-} mice (Fig. 6C). Thus, our data support the hypothesis that PGE2 produced in the plaques aggravates atherothrombosis.

Discussion

It was not possible to predict what would be the *in vivo* action of PGE2, if any, from its *in vitro* effects which are both inhibition and potentiation of platelet aggregation. Then, studies identified EP3 as the receptor mediating the potentiating effect, and showed that *in vivo* PGE2 might exert its potentiating effect on venous thrombosis (14;16). However, these studies did not establish whether PGE2 is produced in physiopathological conditions nor whether PGE2 modifies the haemostatic balance in arterial flow where thrombosis is tightly controlled by endothelial production of potent inhibitors. Our present studies show that PGE2 is produced by the arterial wall in response to inflammation and shifts the local haemostatic balance towards a pro-thrombotic state. These data allow us to conclude that PGE2 has an *in vivo* pro-thrombotic role. Moreover, our studies of the atherosclerotic plaques demonstrate that thrombosis induced by a rupture of the fibrous cap is clearly enhanced by the plaque-produced PGE2. This suggests that PGE2 modulates the thrombogenic potential of the plaque.

However, the impact of low PGE2 levels on thrombosis was examined in a recent study, using mice deficient for one of the enzymes catalysing the last step in PGE2 biosynthesis, the mPGES-1 (21). To our surprise, arterial thrombosis was not significantly decreased in *mPGES-1*^{-/-} mice, suggesting that PGE2 did not potentiate *in vivo* platelet aggregation, at least when thrombosis was induced by endothelial oxidative stress resulting from local excitation of Rose bengal. Using the same model of endothelial injury, we indeed could not observe any difference in the extent of fluorescent thrombosis detected in mice injected with WT versus EP3-deficient platelets. However, we were also unable to detect significant levels of PGE2 in arterial walls of WT mice subjected to this oxidative stress. The Rose bengal-laser model induces thrombosis before inflammatory mechanisms could produce the PGE2 level required for its potentiating effect, and it is likely that inflammation takes place secondarily when PGE2 cannot influence anymore an already maximal thrombosis. So, the inability of this model to produce PGE2 when thrombosis develops explains the lack of difference between WT and *mPGES-*

I-/- mice. On another hand, this limitation highlights the fact that some models of thrombosis might not have a clear pathophysiological significance. This prompted us to examine the effect of PGE2 in a clearly more pathophysiological condition, like atherothrombosis.

A role for PGE2 in atherothrombosis has been previously suggested, however through an indirect mechanism. From association studies showing co-localisation of macrophages, mPGES-1 and metalloproteases, it was deduced that PGE2 might stimulate metalloproteases to thin the fibrous cap. The subsequent increased vulnerability of the plaque might favour atherothrombosis. This concept links PGE2 to atherothrombosis through a suggested action on plaque stability (8). Our study used direct tissue detection and confirmed that atherosclerotic plaques produce PGE2. Above all, our work links PGE2 to atherothrombosis through its direct action on platelets and thrombosis, showing it increases the platelet sensitivity to their agonists *in vivo*.

We established this direct link in mice, not in human. However, a high homology (in the range of 80-90%) was found between mouse and human gene sequences coding for the PGE2 receptors (15). In addition, mouse and human distribution pattern of EP receptors on platelets are very similar, since in both species RT-PCR showed obvious EP3 and EP4 bands, while the EP2 band was really faint (16;29). This is consistent with *in vitro* platelet responses to PGE2 which are very similar in mouse (14) and in human (13;30;31). Altogether, these data show a high similarity between mouse and human platelet behaviour in response to PGE2, suggesting that PGE2 facilitates arterial thrombosis also in human.

PGE2 appears here as a molecule playing a role in vascular wall homeostasis, through its action in limited healing thrombosis. Indeed, the fact that PGE2 facilitated thrombosis in the arterial flow in response to inflammation indicates that its *in vivo* effect is sufficient to oppose PGI2. Therefore, even when a small vascular lesion releases or exposes low amounts of agonists, the concentrations of which are below the platelet activation threshold, the presence of PGE2 produced by local inflammation may

sensitize platelets and foster healing thrombosis. Conversely, PGI₂ produced upon inflammation by neighboring functional endothelial cells limits the extent of thrombosis (32) to restrict it to the lesion. Hence PGE₂ catalyses healing thrombosis on small lesions while PGI₂ restricts its amplification to keep it focalized (Fig. 7).

On the contrary, PGE₂ produced by the plaques must be regarded as a harmful molecule, since it aggravates atherothrombosis. Here, PGE₂ present in subendothelial connective tissue sensitizes platelets that adhered to a mere erosion and facilitates local thrombosis. Providing that the surrounding endothelium on the plaque is dysfunctional (33;34), the nascent thrombosis is incompletely controlled by the deficient local production of NO and/or PGI₂. Thus, PGE₂ might trigger a massive and occluding thrombosis on a mere endothelial erosion.

To prevent this dreadful sequence, the effect of PGE₂ should be inhibited. PGE₂ has numerous functions in various physiological systems, implying that inhibition of its production might induce unexpected side effects. Inhibiting the EP₃ receptor instead might be safer, especially considering that the EP₃ receptor has multiple isoforms (35). Therefore a drug targeting the platelet EP₃ isoform which inhibits adenylate cyclase might be much more specific than a drug inhibiting PGE₂ production. Such a drug should improve the current limited efficiency in preventing myocardial infarction (36;37). Indeed, acetylsalicylic acid at low doses, the treatment of reference, inhibits COX-1 in platelets but does not alter COX-2 that produces PGE₂ in plaques. In addition, specific inhibition of COX-2 that could be beneficial in decreasing the PGE₂ level has been in fact detrimental due to concomitant inhibition of PGI₂ (38). Specific inhibition of the platelet EP₃ receptor will shift the haemostatic balance towards an anti-thrombotic state by inhibiting the facilitating effect of PGE₂ and allowing PGI₂ to predominate. Finally, keeping in mind that PGE₂ is produced by the arterial wall in response to inflammation, such a treatment would theoretically decrease only thrombosis triggered by inflammation.

In conclusion, we have shown here that the potentiating effect of PGE₂ has a clear *in vivo* significance. Through its platelet EP₃ receptor, PGE₂ is a full actor in intra-vascular haemostasis in inflammatory conditions, appearing as another link between inflammation and thrombosis. As a major consequence, we demonstrated that PGE₂ exacerbates atherothrombosis. This unexpected role for PGE₂ opens new possibilities for preventing myocardial infarction or stroke.

Methods

Mice. Homozygous *Apo-E*^{-/-} mice were from Jackson Laboratories (Bar Harbor, MA). *Ep3*^{-/-} and *Tp*^{-/-} mice were described previously (39;40). *Ep3*^{-/-} and *Apo-E*^{-/-} mice have been intercrossed to obtain double mutant mice. All these strains were maintained on a C57BL/6 genetic background. Animal procedures were approved by the local committee for animal ethics (CREMEAS, Strasbourg, France). The investigator was unaware of the genotype of mice throughout the experiments.

PGE₂ detection. PGE₂ levels were determined from mashed tissues, using an Enzyme immunoassay (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK). In a first group, the left common carotid of mice was dissected free and a strip of parafilm was slipped below the carotid for topical application of 100% EtOH (vehicle) or 40μL of AA (50mg/ml in EtOH, Sigma) for 10 min. The carotid was harvested and snap-frozen 30 min later. In a second group, a non-constrictive polyethylene collar (0.38 mm inner, Biotrol, Paris, France) was placed loosely around the left common carotid as previously described (17) for three weeks. In a third group, aorta of at least 35 weeks-old *ApoE*^{-/-} mice were harvested from the aortic valves to the renal bifurcation and snap-frozen. In the last group, *ApoE*^{-/-} mice were fed a high fat diet (# D12336i, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) for four weeks.

Visual scoring of arterial thrombosis. Carotids were exposed to 100mg/ml AA for 10-min and thrombosis was scored 2 hours later under magnification using a visual scale from 0 to 4 (18).

Quantification of thrombosis induced in healthy carotids. Whole blood collected on 0.38% sodium citrate was centrifuged at 100xg to allow separation of platelets. Washed platelets were incubated with 300ng/ml calcein AM (Molecular Probe) in Tyrode's buffer for 15 minutes in the dark. Washed labeled platelets were then injected in the jugular vein of receiver mice. The treated carotid was placed under a

fluorescent microscope (“MacroFluo”, Leica Microsystems, Herbrugg, Switzerland) for video-recording thrombosis at 480 nm. Images extracted from the 40-min recorded movie were computer-processed for counting the number of green pixels. Thrombosis extent was expressed as the total number of green pixels divided by the duration of the experiment in minutes (pixels/min).

Models of thrombogenesis. Thrombosis induced by AA was recorded after the carotid was exposed to 100mg/ml AA for 25 minute. Thrombosis induced by ferric chloride 5% (1 μ L, Sigma) was recorded immediately after the topical application. The photochemical injury followed the procedure previously described (21) except that thrombosis was quantified by fluomacroscopy, as described above. Rose bengal (Fischer Scientific International) was diluted in PBS, injected in jugular vein in a volume of 0.12ml at a concentration of 50 mg/Kg. The laser (1.5-mW, 540 nm, Melles Griot) was applied from a distance of 5 cm for 4s, 45s or 30-min. The carotid was then harvested and snap-frozen for PGE2 detection.

Platelet aggregation. Aggregation tests were performed in an optical Chronolog aggregometer, using 250 μ L of PRP adjusted to 300 000 platelets/ μ L. Collagen was from Chronolog. Homogenates were obtained by mashing plaques in saline at a concentration of 80mg/ml. Aspirin-treated *ApoE*^{-/-} mice received daily 500mg/Kg of aspegic (Sanofi-Synthelabo, France) by IP route for 8 days. Each homogenized plaque was used for both PGE2 detection and aggregation tests.

AA-induced atherothrombosis. Mice (> 55 weeks) received fluorescent platelets and one carotid was exposed. An injection chamber was made by isolating an arterial segment bearing at least one plaque from blood flow with temporary ligatures (Fig. 5A). Once washed, the chamber was filled with DMSO for 10 min before the blood flow returned. A 10-min movie ensured that DMSO did not induce

thrombosis. After ligatures were placed again, the vascular chamber was filled with a 2 μ L-solution of AA 2 μ g/ml (in DMSO) for 10 min. Once blood reflowed, thrombosis was recorded through a double bandpass optical filter (525 nm and 605 nm) for 30 min.

Rupture-induced atherothrombosis. After its tips has been curved, a clean 30G needle was introduced through a small collateral of internal carotid (Fig. 6A). Under magnification, the tip of the needle was positioned next to the distal edge of the plaque, applied to the plaque and pulled backward under visual control. The collateral artery was ligatured and the mouse placed under the fluomicroscope for 20 min. for video-recording. The carotid was then harvested, fixed in glutaraldehyde 2.5% overnight, in cacodylate buffer for a few minutes, post-fixed for 60-min in 4% osmium tetroxide, dehydrated in increasing ethanol concentrations, critical point dried with hexamethyldisilazane, mounted, sputter coated with palladium and examined with a Philips XL20 scanning electron microscope. Rupture area were measured using Scion Image.

En face atherosclerosis analysis. Anesthetized mice were infused with 10% neutral buffered formalin. Aorta were dissected, placed overnight in formalin at 4°C, opened longitudinally and stained with Black Sudan 0.5%. Measurements of the plaque area were performed using Scion Image.

Statistics. Statistical tests were bilateral and non paired student t tests. When variances were not comparable, we used the bilateral non paired Welch-corrected t test. To compare more than two groups with non-Gaussian distribution, we used the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test. Means are expressed \pm SEM. All tests were performed using GraphPad Prism version 3.0 for Windows (GraphPad Software for Science Inc., San Diego, California, USA). A *P* value of less than 0.05 denotes statistical significance.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants (to JE Fabre) from the “Fondation de France”, the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM) and in part by four PhD grants (to S. Gross) from “NSFA” (Nouvelle Société Française d’Athérosclérose) associated with Fournier laboratories, “GEHT” (Groupe d’Etudes sur l’Hémostase et la Thrombose), FRM and ARC (Association de Recherche contre le Cancer). The authors have no conflicting financial interests. We want to thank warmly BH Koller (UNC, NC, USA) for the EP3 mice, and TM Coffman (Duke, NC, USA) for the TP mice.

References

1. Ross,R. 1999. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am.Heart J.* 138:S419-S420.
2. Hansson,G.K. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N.Engl.J.Med.* 352:1685-1695.
3. Robbie,L. and P.Libby. 2001. Inflammation and atherothrombosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 947:167-179.
4. van der Wal,A.C., A.E.Becker, C.M.van der Loos, and P.K.Das. 1994. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 89:36-44.
5. Farb,A., A.P.Burke, A.L.Tang, T.Y.Liang, P.Mannan, J.Smialek, and R.Virmani. 1996. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 93:1354-1363.
6. Burke,A.P., F.D.Kolodgie, A.Farb, D.K.Weber, G.T.Malcom, J.Smialek, and R.Virmani. 2001. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* 103:934-940.
7. Schonbeck,U., G.K.Sukhova, P.Graber, S.Coulter, and P.Libby. 1999. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am.J.Pathol.* 155:1281-1291.
8. Cipollone,F., C.Prontera, B.Pini, M.Marini, M.Fazia, D.De Cesare, A.Iezzi, S.Ucchino, G.Boccoli, V.Saba, F.Chiarelli, F.Cuccurullo, and A.Mezzetti. 2001. Overexpression of Functionally Coupled Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E Synthase in Symptomatic

Atherosclerotic Plaques as a Basis of Prostaglandin E2-Dependent Plaque Instability. *Circulation* 104:921-927.

9. Matsumoto,H., H.Naraba, M.Murakami, I.Kudo, K.Yamaki, A.Ueno, and S.Oh-ishi. 1997. Concordant induction of prostaglandin E2 synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E2 over thromboxane and prostaglandin D2 in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 230:110-114.
10. Brock,T., R.McNish, and M.Peters-Golden. 1999. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J.Biol.Chem.* 274:11660-11666.
11. Cipollone,F., M.Fazia, A.Iezzi, G.Ciabattoni, B.Pini, C.Cuccurullo, S.Ucchino, F.Spigonardo, M.De Luca, C.Prontera, F.Chiarelli, F.Cuccurullo, and A.Mezzetti. 2004. Balance between PGD synthase and PGE synthase is a major determinant of atherosclerotic plaque instability in humans. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24:1259-1265.
12. Belton,O.A., A.Duffy, S.Toomey, and D.J.Fitzgerald. 2003. Cyclooxygenase isoforms and platelet vessel wall interactions in the apolipoprotein E knockout mouse model of atherosclerosis. *Circulation* 108:3017-3023.
13. Shio,H. and P.Ramwell. 1972. Effect of prostaglandin E2 and aspirin on the secondary aggregation of human platelets. *Nature* 236:45-46.
14. Fabre,J.E., M.Nguyen, K.Athirakul, K.Coggins, J.D.McNeish, S.Austin, L.K.Parise, G.A.FitzGerald, T.M.Coffman, and B.H.Koller. 2001. Activation of the murine EP3 receptor for PGE(2) inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation. *J.Clin.Invest* 107:603-610.

15. Narumiya,S., A.Sugimoto, and F.Ushikubi. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol.Rev.* 79:1193-1226.
16. Ma,H., A.Hara, C.Y.Xiao, Y.Okada, O.Takahata, K.Nakaya, Y.Sugimoto, A.Ichikawa, S.Narumiya, and F.Ushikubi. 2001. Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3). *Circulation* 104:1176-1180.
17. der Thusen,J.H., T.J.van Berkel, and E.A.Biessen. 2001. Induction of rapid atherogenesis by perivascular carotid collar placement in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 103:1164-1170.
18. Murata,T., F.Ushikubi, T.Matsuoka, M.Hirata, A.Yamasaki, Y.Sugimoto, A.Ichikawa, Y.Aze, T.Tanaka, N.Yoshida, A.Ueno, S.Oh-ishi, and S.Narumiya. 1997. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 388:678-681.
19. Kurz,K.D., B.W.Main, and G.E.Sandusky. 1990. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb.Res.* 60:269-280.
20. Smith,J.B., C.Ingerman, J.J.Kocsis, and M.J.Silver. 1973. Formation of prostaglandins during the aggregation of human blood platelets. *J.Clin.Invest* 52:965-969.
21. Cheng,Y., M.Wang, Y.Yu, J.Lawson, C.D.Funk, and G.A.FitzGerald. 2006. Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *J.Clin.Invest* 116:1391-1399.

22. Patel,S.S., R.Thiagarajan, J.T.Willerson, and E.T.H.Yeh. 1998. Inhibition of α_4 Integrin and ICAM-1 Markedly Attenuate Macrophage Homing to Atherosclerotic Plaques in ApoE-Deficient Mice. *Circulation* 97:75-81.
23. Swirski,F.K., M.J.Pittet, M.F.Kircher, E.Aikawa, F.A.Jaffer, P.Libby, and R.Weissleder. 2006. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103:10340-10345.
24. Griendling,K.K. and G.A.FitzGerald. 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 108:2034-2040.
25. Penz,S., A.J.Reininger, R.Brandl, P.Goyal, T.Rabie, I.Bernlochner, E.Rother, C.Goetz, B.Engelmann, P.A.Smethurst, W.H.Ouwehand, R.Farndale, B.Nieswandt, and W.Siess. 2005. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *Faseb J.* 19:898-909.
26. Li,R., K.P.Mouillesseaux, D.Montoya, D.Cruz, N.Gharavi, M.Dun, L.Koroniak, and J.A.Berliner. 2006. Identification of prostaglandin E2 receptor subtype 2 as a receptor activated by OxPAPC. *Circ.Res.* 98:642-650.
27. Rother,E., R.Brandl, D.L.Baker, P.Goyal, H.Gebhard, G.Tigyi, and W.Siess. 2003. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 108:741-747.
28. Toschi,V., R.Gallo, M.Lettino, J.T.Fallon, S.D.Gertz, A.Fernandez-Ortiz, J.H.Chesebro, L.Badimon, Y.Nemerson, V.Fuster, and J.J.Badimon. 1997. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 95:594-599.

29. Paul, B.Z.S., B.Ashby, and S.B.Sheth. 1998. Distribution of prostaglandin IP and EP receptor subtypes and isoforms in platelets and human umbilical artery smooth muscle cells. *British Journal of Haematology* 102:1204-1211.
30. MacIntyre, D. and J.Gordon. 1975. Calcium-dependent stimulation of platelet aggregation by PGE₂. *Nature* 258:337-339.
31. Gray, S. and S.Heptinstall. 1991. Interactions between prostaglandin E₂ and inhibitors of platelet aggregation which act through cyclic AMP. *Eur.J Pharmacol.* 194:63-70.
32. Cheng, Y., S.C.Austin, B.Rocca, B.H.Koller, T.M.Coffman, T.Grosser, J.A.Lawson, and G.A.FitzGerald. 2002. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 296:539-541.
33. Ganz, P. and J.A.Vita. 2003. Testing endothelial vasomotor function: nitric oxide, a multipotent molecule. *Circulation* 108:2049-2053.
34. Lerman, A. and A.M.Zeiher. 2005. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 111:363-368.
35. Irie, A., Y.Sugimoto, T.Namba, A.Harazono, A.Honda, A.Watabe, M.Negishi, S.Narumya, and A.Ichikawa. 1993. Third isoform of the prostaglandin E-receptor EP₃ subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Eur.J Biochem* 217:313-318.
36. 1994. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *BMJ* 308:81-106.

37. Bhatt,D.L., K.A.Fox, W.Hacke, P.B.Berger, H.R.Black, W.E.Boden, P.Cacoub, E.A.Cohen, M.A.Creager, J.D.Easton, M.D.Flather, S.M.Haffner, C.W.Hamm, G.J.Hankey, S.C.Johnston, K.H.Mak, J.L.Mas, G.Montalescot, T.A.Pearson, P.G.Steg, S.R.Steinhubl, M.A.Weber, D.M.Brennan, L.Fabry-Ribaudo, J.Booth, and E.J.Topol. 2006. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N.Engl.J.Med.* 354:1706-1717.
38. FitzGerald,G.A. 2004. Coxibs and cardiovascular disease. *N.Engl.J.Med.* 351:1709-1711.
39. Fleming,E.F., K.Athirakul, M.I.Oliverio, M.Key, J.Goulet, B.H.Koller, and T.M.Coffman. 1998. Urinary concentrating function in mice lacking EP3 receptors for prostaglandin E₂. *American Journal of Physiology* 275:F955-F961.
40. Thomas,D., R.Mannon, P.Mannon, A.Latour, J.Oliver, M.Hoffman, O.Smithies, B.Koller, and T.Coffman. 1998. Coagulation defects and altered hemodynamic response in mice lacking receptors for thromboxane A₂. *J Clin.Invest.* 102:1994-2001.

Figure legends

Figure 1

Vascular wall-produced PGE2 facilitates arterial thrombosis through its EP3 receptor.

A, PGE2 content of murine carotid arteries after peri-adventitial delivery of ethanol versus AA 50 mg/ml or after placement of a polyethylene collar for three weeks (cuff) versus non exposed carotids (control). *** $P < 0.0001$. **B**, Left: Representative curves of thrombosis induced in carotid of one $Ep3^{+/+}$ versus one $Ep3^{-/-}$ mouse by peri-adventitial application of AA 100 mg/ml. Each point on the curve represents the number of green pixels detected on each of the 12 images video-recorded per second, and reflects the number of accumulating platelets. Each peak represents the formation, growth and detachment of a thrombus carried away by bloodstream. Thrombosis extent was measured as the grey area under the curve. Right: Images of AA-induced thrombus (green light) observed at 15-min in one $Ep3^{+/+}$ (top) versus one $Ep3^{-/-}$ (bottom) mouse. Arrows indicate the carotid walls. **C**, Extent of vehicle (ethanol)- or AA-induced thrombosis in $Ep3^{+/+}$ mice versus $Ep3^{-/-}$ mice. *** $P < 0.001$, and ** $P < 0.01$. **D**, Extent of ferric chloride (FeCl₃, 5%)-induced thrombosis in $Ep3^{+/+}$ mice versus $Ep3^{-/-}$ mice. * $P = 0.011$. Horizontal lines indicate the mean value for each group. AA : arachidonic acid.

Figure 2

The *in vitro* facilitating effect of PGE2 is not induced by activated platelets.

A, Representative traces of aggregation of WT (green traces) versus EP3 deficient (red traces) platelets activated by collagen, 1.5 (upper) or 2 μ g/ml (bottom). These doses were chosen to induce respectively partial and submaximal aggregation to ensure that any potentiation could be evidenced. The increase in light transmission indicates an increase in aggregation of platelets. **B**, Quantitative analysis showing that the maximal aggregation of platelets was not altered by absence of the EP3 receptor to PGE2.

Figure 3

In vivo Rose bengal-induced oxidative stress of endothelium does not stimulate local production of PGE2.

A, Representative images of thrombosis (green light) induced by oxidative stress due to laser-excitation of Rose bengal. Only a few clots are formed at 4s while already massive thrombosis is seen at 45s. Arrows indicate carotid walls. **B**, Amount of PGE2 detected in carotid tissue after 4 or 45s of oxidative stress, showing that PGE2 was not increased at the beginning of thrombosis (compare to Fig. 1A), nor when thrombosis was massive. Horizontal lines indicate the mean value for each group.

Figure 4

Murine atherosclerotic plaques produce functional PGE2.

A, PGE2 content of aortic arteries from *ApoE*^{+/+} versus *ApoE*^{-/-} mice, showing that PGE2 tissue content is increased by the mere presence of atherosclerotic plaques, especially when the development of plaques was accelerated by a high fat diet for three weeks. **P*<0.05, ****P*<0.001. HFD: High Fat Diet.

B, Representative traces and quantitative analysis showing *Ep3*^{+/+} vs *Ep3*^{-/-} platelet aggregation in response to 0.5 mg/ml of murine homogenized plaques. The lack of EP3 on platelets strikingly reduced their response to the plaque material, indicating that a molecule produced inside the plaques activates EP3. **P* = 0.002. **C**, Representative traces and quantitative analysis of platelet aggregation induced by murine homogenized plaques extracted from *ApoE*^{-/-} mice treated by high doses of aspirine, documenting the absence of difference between *Ep3*^{+/+} vs *Ep3*^{-/-} platelet responses when PGE2 production is depressed.

Horizontal lines indicate the mean value in each group.

Figure 5

PGE₂ found in murine atherosclerotic plaques can act on blood platelets.

A, cartoon depicting the *in vivo* set-up used for endoluminal delivery of AA at low concentrations to the plaque. **B**, Images from movies recorded under fluorescence, showing a segment of carotid with a plaque in yellow (autofluorescence) and thrombi in green. Top picture shows an example of the absence of response to 2µg/ml AA in healthy carotid. Conversely, thrombosis developed on plaques after the same amount of AA was delivered in carotids of double mutant mice (*ApoE*^{-/-} x *Ep3*^{-/-}) injected with WT (middle) or *Ep3*^{-/-} (bottom) platelets. **C**, Quantitative analysis of experiments depicted in the panel A. The chosen dose of AA never induced thrombosis in the absence of plaque (control, platelets *Ep3*^{+/+}), while thrombosis observed on plaques in double mutants injected with WT platelets (*ApoE*^{-/-} x *Ep3*^{-/-}, platelets *Ep3*^{+/+}) was significantly decreased when platelets lacked EP3 (*ApoE*^{-/-} x *Ep3*^{-/-}, platelets *Ep3*^{-/-}). *** *P* < 0.001, * *P* < 0.05. Horizontal lines indicate the mean value for each group. DKO: double knocked-out.

Figure 6

Atherothrombosis triggered by rupture of the plaque is exacerbated by PGE₂.

A, Cartoon depicting the set-up we used to rupture murine plaques *in vivo* with a needle. **B**, Scanning electron microscopy photographs showing the rupture induced by the passage of the needle on two plaques. The scale bars represents 100 (top) and 50 µm (bottom). **C**, Quantitative analysis of thrombosis measured at the surface of ruptured plaques in *ApoE*^{-/-} mice, showing that absence of EP3 on platelets almost suppressed atherothrombosis that developed in presence of WT platelets. ** *P* = 0.0081. Horizontal lines indicate the mean value for each group.

Figure 7

Proposed model for *in vivo* action of PGE2/EP3 upon thrombosis.

Platelet agonists activate their specific receptor R, triggering the signaling cascade and exposing the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ which is crucial for platelet aggregation. Inflammation of the vessel or rupture of the plaque release PGE2 locally. Activation of its EP3 receptor on platelets decreases the internal level of cAMP while activation of IP receptor by endothelium-produced PGI2 increases it. This balance between PGE2 and PGI2 eventually determines the intra-cellular level of cAMP. Since the cAMP level inhibits some steps of the signaling cascade activated by R, the balance ultimately regulates the platelet capability to aggregate in response to its agonists. Hence, platelet rupture or vessel wall inflammation enhance platelet aggregability via their release of PGE2.

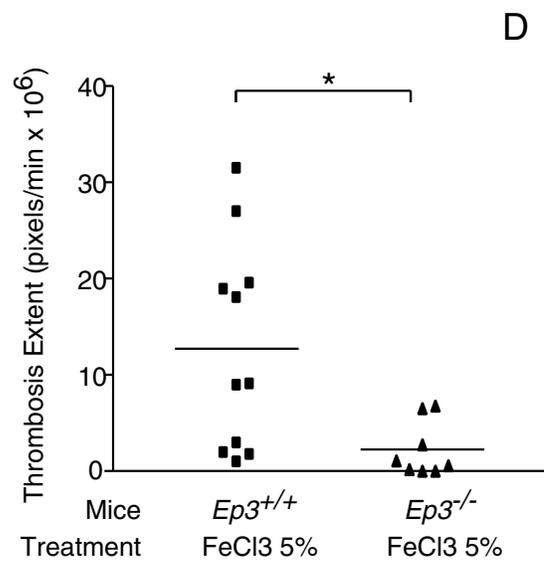
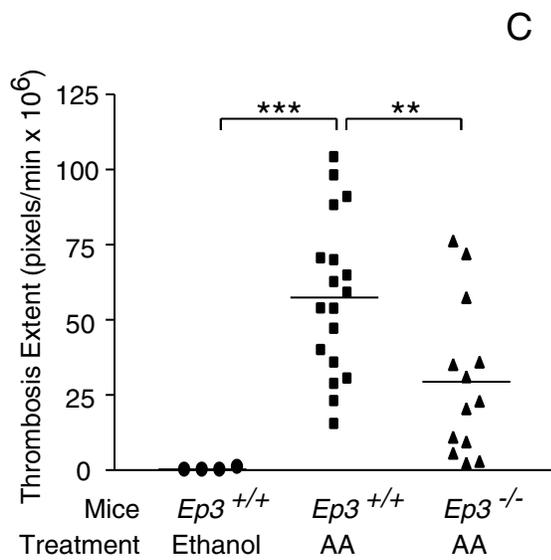
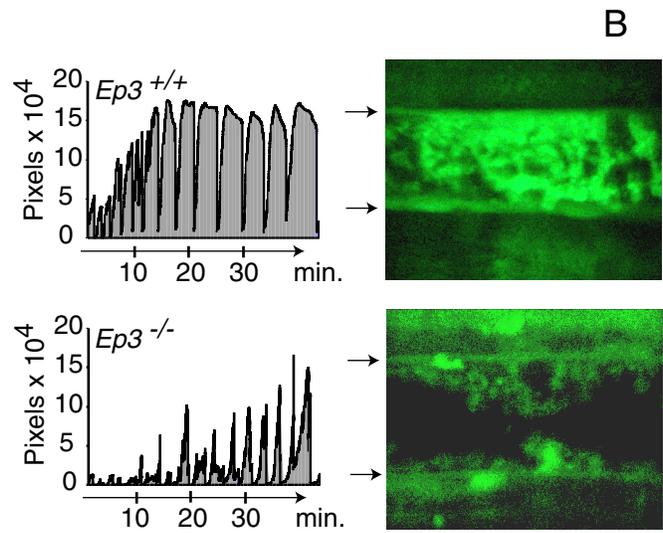
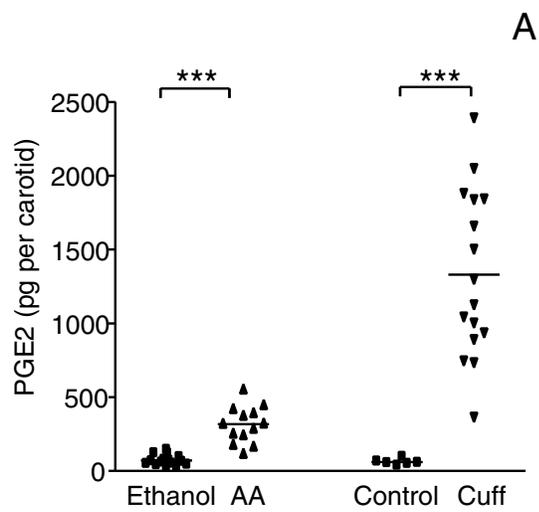
Movie A

Effect of AA peri-adventitial delivery (100 mg/ml) to murine carotid. Thrombosis developed better in *Ep3^{+/+}* (top) than in *Ep3^{-/-}* (bottom) mice. Top and bottom panels show part of carotid arteries, in which green (fluorescent) thrombi formed after WT versus *Ep3^{-/-}* fluorescent platelets were injected in mice. Here are shown 8-min sequences of movies recorded at 25 images per second. These two sequences are contemporary, being picked at the same moment in the experiment, a few minutes after thrombosis started. The video sequences have been shortened by keeping only 1 image out of 21 recorded images.

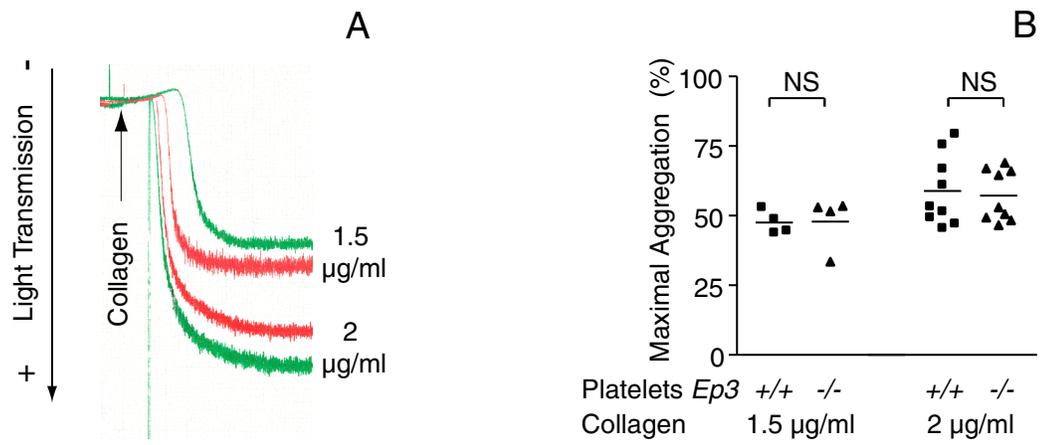
Movie B

Thrombosis induced by intra-luminal delivery of AA (2 μ g/ml) to murine plaque developed better in presence of platelets harboring EP3. Atherosclerotic plaque appears in yellow, and fluorescent thrombosis is green. *ApoE^{-/-}* mice were injected with WT (top) versus EP3 deficient (bottom) platelets.

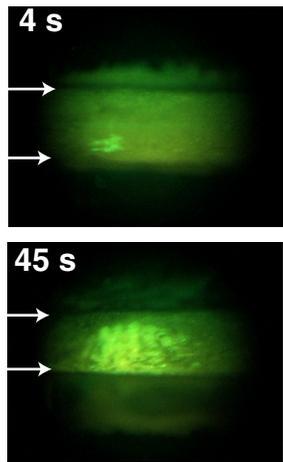
Here are shown contemporary 8-min sequences of movies recorded at 25 images per second. These two sequences are contemporary, being picked at the same moment in the experiment. The video sequences have been shortened by keeping only 1 image out of 21 recorded images.



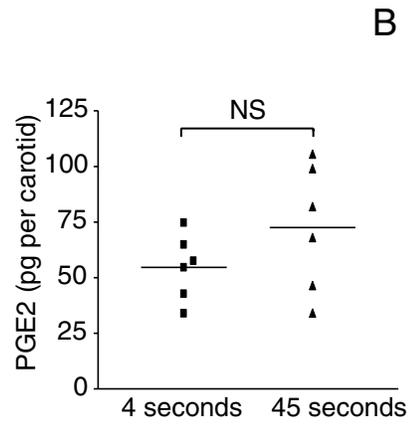
S. Gross - Figure 1



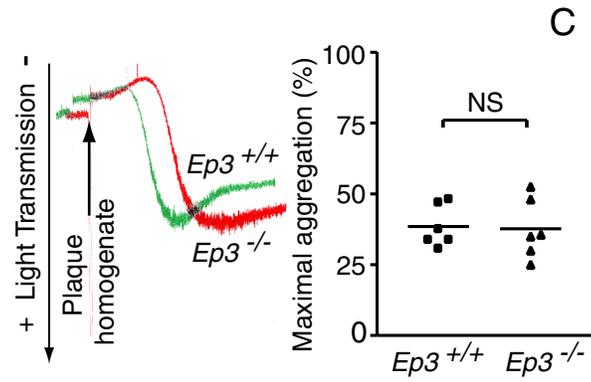
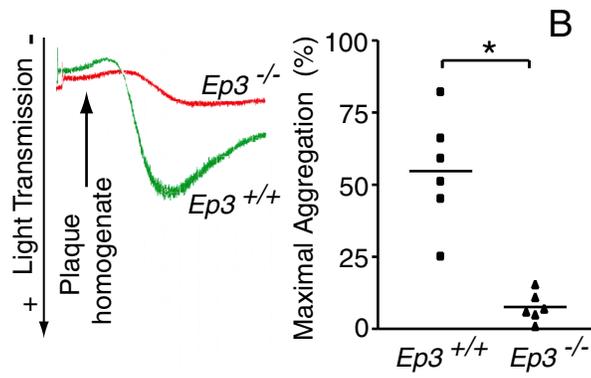
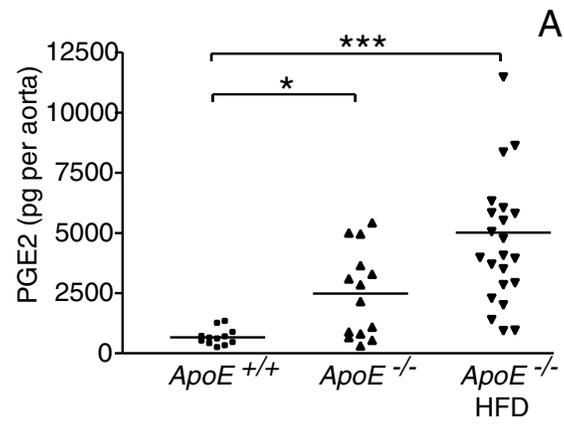
S. Gross - Figure 2



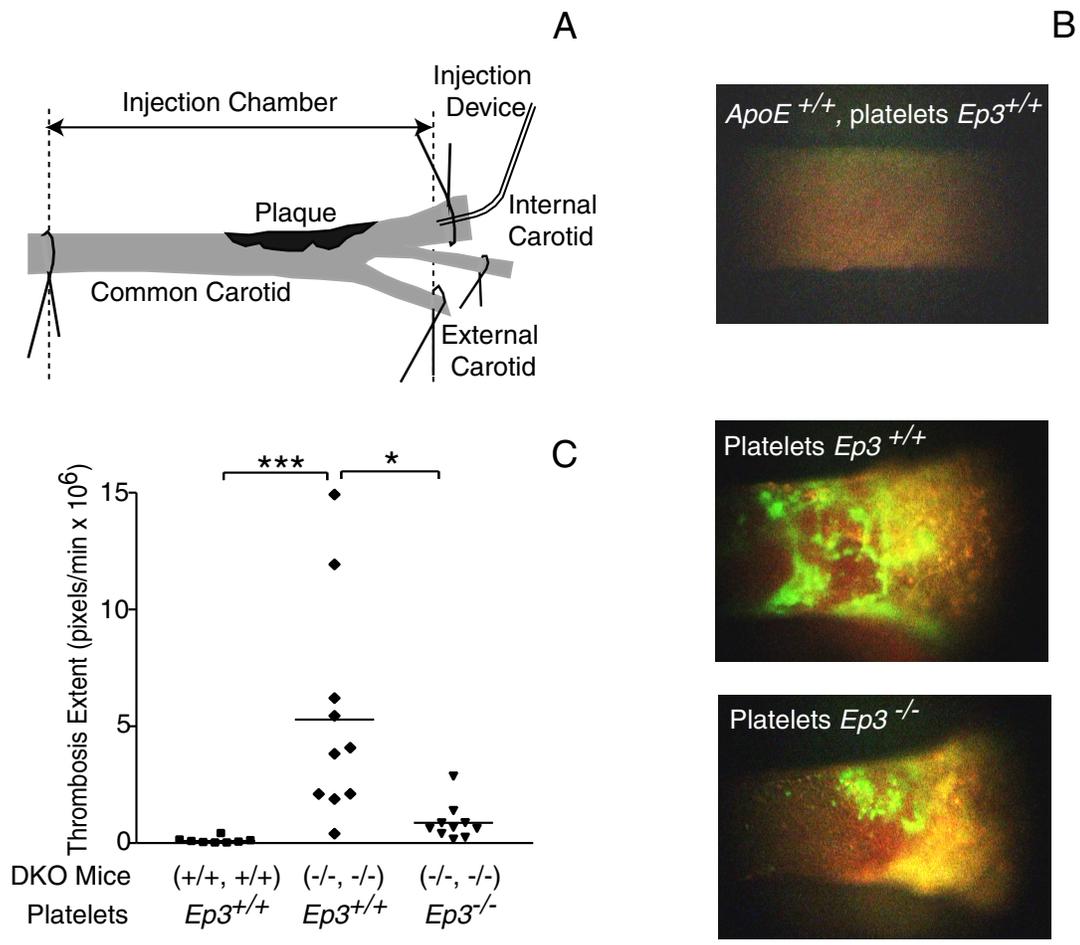
A



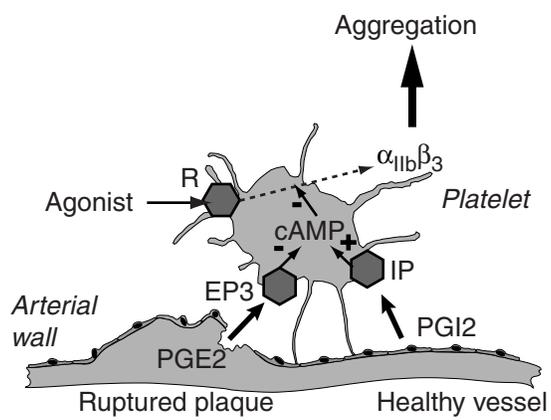
S. Gross - Figure 3



S. Gross - Figure 4



S. Gross - Figure 5



S. Gross - Figure 7

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Discussion

1. La PGE2 : un nouveau lien inflammation-thrombose *in vivo*

Il n'était pas évident de prédire l'action *in vivo* de la PGE2 à partir des données *in vitro* publiées dans les années 1980. En effet, la PGE2 n'agit apparemment pas sur l'agrégation plaquettaire. Par contre, elle change l'état de la plaquette en modifiant le niveau intracellulaire d'AMPc. Ce changement ne devient visible en terme d'agrégation qu'en présence de faibles concentrations d'agonistes de l'agrégation. Dans ces conditions, la PGE2 induit des actions opposées sur l'agrégation plaquettaire. Quand elle est présente elle-même à de faibles concentrations, la PGE2 facilite l'agrégation plaquettaire, via son récepteur EP3^{84,89}. A l'inverse, de fortes concentrations de PGE2 inhibent non spécifiquement l'agrégation plaquettaire en activant le récepteur IP de la PGI2, puissant anti-agrégant^{83,84}. La co-existence de ces deux effets *in vitro* posait la question de l'effet de la PGE2 *in vivo* : facilitation ou inhibition ? Des études avaient montré l'action facilitatrice de la PGE2 *in vivo* après la délivrance d'importantes quantités d'AA dans le lit veineux^{84,89}. Cela indique que l'effet facilitateur de la PGE2 prédomine *in vivo*. Mais ces données ont été acquises en réponse à l'administration exogène d'AA et au niveau veineux. La question qui se posait alors était de déterminer si la production de PGE2 induite par une inflammation dans un contexte physiopathologique est suffisante pour encore entraîner cet effet facilitateur. Et ensuite, il a fallu vérifier que cet effet facilitateur n'est pas neutralisé dans le lit artériel par la production endothéliale d'inhibiteurs de l'agrégation, comme le NO et la PGI2, qui sont moins produits dans le lit veineux.

Il fallait donc déterminer si la PGE2 joue un rôle en physiopathologie en modulant la balance hémostatique dans le lit artériel.

Mon travail montre que la PGE2 produite par la paroi artérielle en réponse à une inflammation facilite la thrombose artérielle locale en activant son récepteur plaquettaire EP3. Cette action dans l'hémostase artérielle est retrouvée au niveau des plaques d'athérosclérose, foyer inflammatoire chronique. Effectivement, la PGE2, synthétisée par les plaques d'athérosclérose, aggrave l'athéromatose. Ainsi, le potentiel thrombogénique de la plaque est augmenté par la synthèse intra-plaque de PGE2.

2. Confrontation aux données de la littérature

a. Influence du niveau de PGE2 sur l'hémostase artérielle

La synthèse de PGE2 résulte de l'activation de la mPGES-1, elle-même couplée à la COX-2. L'inhibition ou la délétion de la mPGES-1 devrait donc diminuer la production de PGE2 et ainsi atténuer le potentiel pro-thrombogène de la paroi artérielle enflammée. La génération de souris invalidées pour le gène codant cette enzyme, les souris *mPGES1*^{-/-} ¹⁹ a montré que l'absence du gène de la mPGES-1 diminue effectivement la production de la PGE2 par les macrophages de 95% ³³⁴. De même, la production urinaire du métabolite de la PGE2 est trouvée diminuée chez ces souris *mPGES-1*^{-/-} ²⁰¹. Par contre et à notre grande surprise, le potentiel thrombogénique de la carotide saine des souris invalidées n'est pas différent de celui des souris sauvages. Ces données contredisaient mes résultats en suggérant que la PGE2 ne facilite pas la thrombose *in vivo* ²⁰¹. Pour leur démonstration, ces auteurs ont utilisé un modèle de thrombose artérielle induite par un stress oxydatif endothélial résultant de l'excitation locale de rose bengale. Dans les mêmes conditions, je n'ai pas détecté de différence dans l'étendue de la thrombose entre des souris *Ep3*^{+/+} et *Ep3*^{-/-}. Par contre, le dosage de la quantité de PGE2 produite par la paroi artérielle de souris sauvages en réponse à ce stress oxydatif est dans la fourchette des valeurs basales. Ainsi, ce modèle induit la formation d'une thrombose artérielle avant même que l'inflammation ne produise suffisamment de PGE2 pour qu'elle exerce son rôle facilitateur. L'inflammation dans ce modèle est secondaire à la thrombose et la PGE2 produite alors n'influence pas l'importance d'une thrombose déjà maximale. Ceci explique l'absence de différence dans l'étendue de la thrombose entre les souris sauvages et *mPGES1*^{-/-} dans ce modèle inapproprié pour tester le rôle de la PGE2 dans la survenue de la thrombose. Cette observation montre que les modèles de thrombose ne sont pas tous adéquats. C'est ce qui m'a amené à considérer les effets de la PGE2 dans une situation la plus proche possible de la physiopathologie, comme l'athéromatose.

b. La PGE2 dans la plaque et dans l'athéromatose

Un rôle de la PGE2 dans l'athéromatose avait déjà été suggéré par d'autres études ^{23,335}. Dans ces études, Cipollone montre que la co-localisation de COX-2, mPGES-1 et de métalloprotéases par immunohistochimie. S'appuyant sur cette identité de lieu, les auteurs suggèrent que la PGE2 stimule la production de MMPs et fragilise ainsi indirectement la

chape fibreuse de la plaque. C'est ainsi que la PGE2 serait liée à l'athéromatose : par l'augmentation de la vulnérabilité de la plaque^{23;335;336}. C'est en fait sur la base d'une colocalisation, et non de la démonstration d'un lien causal, que les auteurs suggèrent un rôle indirect de la PGE2 dans la fragilisation de la plaque, et non dans sa rupture. Mon travail de thèse démontre directement la production de PGE2 par la plaque d'athérosclérose. Mais par dessus tout, ma thèse démontre que cette PGE2 agit directement sur les plaquettes et joue donc un rôle direct sur l'athéromatose. Mes résultats ne s'opposent pas nécessairement à ceux de Cipollone, mais sont plus convaincants dans la mesure où mes arguments sont directs et de nature causale.

3. *L'intérêt de la présente étude*

a. La PGE2 est bénéfique sur la paroi artérielle saine

Les conclusions de mes études permettent maintenant d'affirmer que la balance entre la PGE2 et la PGI2 est cruciale dans le contrôle de l'hémostase artérielle locale *in vivo*. *In vitro*, cette balance entre les effets de la PGE2 et de la PGI2 régule le niveau de réponse des plaquettes. *In vivo*, en situation physiologique, il est admis que l'hémostase artérielle est sous la dépendance d'un équilibre entre l'effet anti-agrégant de la PGI2 et l'effet pro-agrégant du TXA2. Cependant, en situation inflammatoire, cet équilibre est modifié à plusieurs niveaux. Le dysfonctionnement endothélial perturbe la synthèse de PGI2 alors que la production de PGE2 par la paroi artérielle augmente le risque de thrombose. La régulation *in vivo* de l'hémostase artérielle locale est alors sous la dépendance du nouveau rapport PGE2/ PGI2, qui d'anti-thrombotique devient facilitateur de la thrombose. Ainsi, même si une petite lésion endothéliale libère des quantités subliminales d'agonistes plaquettaire, la présence de PGE2 facilite l'agrégation des plaquettes en diminuant leur seuil d'activation. Cela peut déclencher une thrombose localisée réparatrice (les plaquettes favorisant la cicatrisation) même sur de minimes lésions. Inversement, la PGI2 produite par les cellules endothéliales voisines de la lésion mais intactes limite l'étendue de cette thrombose et la restreint ainsi à la seule lésion. Finalement, en situation d'inflammation, la PGE2 facilite *in vivo* la thrombose artérielle alors que la PGI2 limite son amplification. Ce concept de balance entre PGE2 et PGI2 met en évidence une relation entre inflammation de la paroi artérielle et thrombose, qui peut être vu comme un mécanisme de réparation. Ce mécanisme est une explication possible à la survenue de thrombose locale compliquant les vascularites.

b. La PGE2 est nocive sur la paroi artérielle malade

Un intérêt tout particulier a été porté sur le rôle de la PGE2 dans une situation d'inflammation chronique, la plaque d'athérosclérose. Produite en abondance par les plaques, la PGE2 sensibilise aussitôt les plaquettes immobilisées par leur adhésion aux structures sous-endothéliales exposées par la rupture. L'athéromatose ainsi facilitée n'est dans ce cas que partiellement contrée par la production endothéliale environnante de PGI2. En effet, le dysfonctionnement endothélial, notamment la perte de fonction du NO et l'augmentation trop faible de la production de PGI2, ne limitent pas aussi efficacement la thrombose locale naissante que lorsque l'endothélium est sain^{337,338}. Dans ce contexte, la PGE2, de par son rôle pro-agrégant favorise la formation d'une thrombose massive et occlusive sur la plaque.

Pour prévenir ce rôle délétère de la PGE2, il faudrait inhiber sa production. Mais la PGE2 intervient dans de nombreux systèmes physiologiques (système neuronal, digestif, génital, vasculaire). Ce qui implique que toute inhibition de sa production devrait entraîner autant d'effets secondaires indésirables. Il est donc plus logique de chercher à inhiber le récepteur plaquettaire de la PGE2 qui est responsable de la facilitation de la thrombose. Ce récepteur est EP3, mais EP3 n'est pas exprimé que sur les plaquettes. Une piste intéressante à explorer s'appuie sur le fait que EP3 a de multiples isoformes (EP3 α , EP3 β et EP3 γ)⁴⁰. Si une isoforme spécifique de l'adénylate cyclase plaquettaire est trouvée, il est alors possible qu'elle constitue une cible pour un inhibiteur spécifique. Un tel médicament devrait alors améliorer l'efficacité limitée des traitements de la prévention des infarctus du myocarde^{306,308}. En effet, les faibles doses d'aspirine, traitement de référence actuel, inhibent l'isoforme COX-1 des plaquettes sans affecter l'expression de l'isoforme inductible COX-2 qui produit la PGE2 dans les plaques d'athérosclérose. De plus, l'inhibition spécifique de COX-2 par les Coxibs qui pourrait avoir un effet bénéfique en diminuant la production de la PGE2 des plaques est néfaste dans la mesure où la production de PGI2 est également inhibée³⁰⁹. Finalement, l'inhibition spécifique du récepteur EP3 contribuera à l'« établissement » d'un état anti-agrégant en inhibant l'effet facilitateur de la PGE2 mais en laissant la PGI2 prédominer dans la balance hémostatique artérielle. Un inhibiteur de EP3 serait un traitement révolutionnaire dans le domaine de la thrombose dans le sens où ce serait la première fois que le corps médical disposerait d'un anti-thrombotique spécifique de l'état inflammatoire, et par conséquent ne modifiant pas le temps de saignement.

4. *Limites des données*

Cette étude a été menée chez la souris et non chez l'homme. Cependant, une grande homologie a été mise en évidence entre les séquences géniques codant pour les récepteurs de la PGE2 : l'alignement de séquence présente environ 80 à 90 % d'homologies²⁴. De plus, la distribution des récepteurs EPs sur les plaquettes est similaire chez la souris et chez l'homme. Ainsi, les études par RT-PCR montrent pour les deux espèces que les bandes de taille correspondantes aux récepteurs EP3 et EP4 sont bien représentées alors que les bandes correspondantes aux récepteurs EP2 et EP1 sont très faible ou absente, respectivement^{89,88}. De plus, les réponses plaquettaires *in vitro* en présence de PGE2 sont identiques chez la souris⁸⁴ et chez l'homme^{93,339,83;340}. Toutes ces données montrent la grande identité des mécanismes mis en jeu par l'action de la PGE2 sur les plaquettes de l'homme et de la souris. Ainsi, la PGE2 devrait faciliter la thrombose artérielle chez l'homme comme elle le fait chez la souris.

5. *Conclusions*

Ce travail montre une propriété inattendue pour la PGE2. J'ai montré que l'inflammation modifie l'hémostase artérielle par la production de PGE2. La PGE2 est ainsi un nouvel acteur dans la relation inflammation/thrombose. La PGE2 aggrave l'athéromatose, ouvrant de nouvelles possibilités thérapeutiques dans la prévention des accidents cardio-vasculaires. Nos données devraient permettre la mise au point d'un anti-agrégant spécifique des états inflammatoires, mais ne modifiant pas la capacité de l'organisme à stopper un saignement sur blessure accidentelle, a priori non inflammatoire au moment de la constitution du caillot.

II. **Perspectives**

Ce travail apporte des réponses aux questions posées initialement, à savoir que la PGE2 exerce un rôle *in vivo* dans la pro-thrombogénicité de la paroi artérielle enflammée, et notamment des plaques d'athérosclérose. Cependant, ce travail pose aussi de nombreuses questions.

Même si l'importance physiopathologique *in vivo* de la PGE2 a été démontrée par mon travail de thèse, son action doit être considérée en fonction de la présence des autres prostaglandines produites au sein de la plaque. Pour cela, un profil HPLC de production des prostanoïdes par les plaques d'athérosclérose définira l'importance relative de la PGE2 par rapport aux autres prostaglandines. Ces études apporteront une meilleure compréhension du comportement de la PGE2 en présence de l'une ou l'autre des prostaglandines synthétisées. La PGDS semble être impliquée dans la stabilité des plaques à l'inverse de la PGES³³⁶ mais encore faut-il le démontrer en dosant ces deux prostaglandines à partir d'échantillons de plaques de patients symptomatiques vs. asymptomatiques. Par ailleurs, l'utilisation de cette technique pourrait apporter quelques explications supplémentaires quant à la survenue de thrombose limitée voire l'absence de thrombose sur des plaques rompues.

Les mécanismes de contrôle de l'activation de la PGES ne sont pas bien connus. L'on sait que l'inflammation module l'expression des enzymes d'amont, notamment les PLA2. La détermination des isoformes enzymatiques de la PLA2 impliquées dans la régulation de la voie de synthèse de la PGE2 permettrait de mieux contrôler sa synthèse. L'expression de la mPGES-1 est sous le contrôle de facteurs de transcription spécifiques. Récemment l'implication du facteur de transcription NF- κ B a été identifiée dans la régulation de la voie de la mPGES-1 et des récepteurs EPs dans les régions vulnérables de la plaque³³⁵. Mais, l'on ne peut se restreindre à la seule implication de NF- κ B. Une piste de recherche dans l'identification de nouveaux facteurs de transcription est certains récepteurs nucléaires, notamment les PPARs ou les RARs^{341,342}. La liaison de lipides à ces récepteurs entraîne leur activation, les sépare de leurs co-répresseurs et permet leur liaison aux régions promotrices de certains gènes. L'on peut alors suggérer que la PGE2 peut se lier à ces récepteurs et participer à la régulation de l'expression de son enzyme mPGES-1. L'identification de nouveaux mécanismes régulateurs de la voie de synthèse de la PGE2 ouvrirait des perspectives dans des traitements thérapeutiques pour limiter la production de PGE2.

Mon étude a été menée sur le modèle murin. La transposition de ces données à l'homme, bien que probable doit être montrée. Pour cela, une collaboration avec les hôpitaux doit être mise en place dans le but d'obtenir des échantillons humains. La présence de mPGES-1 dans les plaques humaines suggère la possibilité d'une synthèse de PGE2 mais qui devra être vérifiée. Il est aussi intéressant de prouver l'existence d'une corrélation entre la quantité de PGE2 dans les lésions athérosclérotiques et les événements cliniques. Par ailleurs, deux études ont montré

que l'effet stabilisateur des statines sur la plaque semble avoir un lien avec la production de PGE2. Nous pourrions étudier si les statines ont une action indirecte sur l'athérombose^{320,343}.

Enfin, l'identification de l'isoforme EP3 mise en jeu dans ce processus est primordiale. Dans un premier temps, la génération de souris génétiquement invalidées pour chacune des isoformes du récepteur EP3 plaquettaire permettrait cette identification. Une fois cette isoforme connue, il sera plus facile pour les instituts pharmacologiques de générer un médicament « type antagoniste » de l'isoforme EP3 en question et ainsi limiter spécifiquement cette action néfaste de la PGE2 sans pour autant diminuer les autres actions de la PGE2.

BIBLIOGRAPHIE

1. von Euler,U.S. 1939. [Further studies of prostaglandin, the physically active substance of certain genital glands]. *Skand. Arch. Physiol* 81:65-80.
2. Ferreira,S.H. and J.R.Vane. 1967. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. *Nature* 216:868-873.
3. Granstrom,E. and B.Samuelsson. 1978. Quantitative measurement of prostaglandins and thromboxanes: general considerations. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 5:1-13.
4. Chandrasekharan,N.V., H.Dai, K.L.Roos, N.K.Evanson, J.Tomsik, T.S.Elton, and D.L.Simmons. 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:13926-13931.
5. Murakami,M. and I.Kudo. 2004. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog. Lipid Res.* 43:3-35.
6. Tanabe,T. and N.Tohnai. 2002. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:95-114.
7. Matsumoto,H., H.Naraba, M.Murakami, I.Kudo, K.Yamaki, A.Ueno, and S.Oh-ishi. 1997. Concordant induction of prostaglandin E2 synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E2 over thromboxane and prostaglandin D2 in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230:110-114.
8. Brock,T.G., R.W.McNish, and M.Peters-Golden. 1999. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* 274:11660-11666.
9. Naraba,H., M.Murakami, H.Matsumoto, S.Shimbara, A.Ueno, I.Kudo, and S.Oh-ishi. 1998. Segregated coupling of phospholipases A2, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 160:2974-2982.
10. Park,J.Y., M.H.Pillinger, and S.B.Abramson. 2006. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin. Immunol.* 119:229-240.
11. Swinney,D.C., A.Y.Mak, J.Barnett, and C.S.Ramesha. 1997. Differential allosteric regulation of prostaglandin H synthase 1 and 2 by arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* 272:12393-12398.

12. Ogino,N., T.Miyamoto, S.Yamamoto, and O.Hayaishi. 1977. Prostaglandin endoperoxide E isomerase from bovine vesicular gland microsomes, a glutathione-requiring enzyme. *J. Biol. Chem.* 252:890-895.
13. Moonen,P., M.Buytenhek, and D.H.Nugteren. 1982. Purification of PGH-PGE isomerase from sheep vesicular glands. *Methods Enzymol.* 86:84-91.
14. Pratt,B.R., R.L.Butcher, and E.K.Inskeep. 1977. Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGE2 in ewes. *J. Anim Sci.* 45:784-791.
15. Jakobsson,P.J., S.Thoren, R.Morgenstern, and B.Samuelsson. 1999. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:7220-7225.
16. Forsberg,L., L.Leeb, S.Thoren, R.Morgenstern, and P.Jakobsson. 2000. Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett.* 471:78-82.
17. Tanioka,T., Y.Nakatani, N.Semmyo, M.Murakami, and I.Kudo. 2000. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275:32775-32782.
18. Watanabe,K., K.Kurihara, Y.Tokunaga, and O.Hayaishi. 1997. Two types of microsomal prostaglandin E synthase: glutathione-dependent and -independent prostaglandin E synthases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:148-152.
19. Trebino,C.E., J.L.Stock, C.P.Gibbons, B.M.Naiman, T.S.Wachtmann, J.P.Umland, K.Pandher, J.M.Lapointe, S.Saha, M.L.Roach, D.Carter, N.A.Thomas, B.A.Durtschi, J.D.McNeish, J.E.Hambor, P.J.Jakobsson, T.J.Carty, J.R.Perez, and L.P.Audoly. 2003. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:9044-9049.
20. Thoren,S. and P.J.Jakobsson. 2000. Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur. J. Biochem.* 267:6428-6434.
21. Murakami,M., H.Naraba, T.Tanioka, N.Semmyo, Y.Nakatani, F.Kojima, T.Ikeda, M.Fueki, A.Ueno, S.Oh, and I.Kudo. 2000. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 275:32783-32792.

22. Schonbeck,U., G.K.Sukhova, P.Grabner, S.Coulter, and P.Libby. 1999. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* 155:1281-1291.
23. Cipollone,F., C.Prontera, B.Pini, M.Marini, M.Fazia, C.D.De, A.Iezzi, S.Ucchino, G.Boccoli, V.Saba, F.Chiarelli, F.Cuccurullo, and A.Mezzetti. 2001. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* 104:921-927.
24. Narumiya,S., Y.Sugimoto, and F.Ushikubi. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 79:1193-1226.
25. Ueno,N., Y.Takegoshi, D.Kamei, I.Kudo, and M.Murakami. 2005. Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338:70-76.
26. Schuster,V.L. 2002. Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:633-647.
27. Kanai,N., R.Lu, J.A.Satriano, Y.Bao, A.W.Wolkoff, and V.L.Schuster. 1995. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 268:866-869.
28. Bao,Y., M.L.Pucci, B.S.Chan, R.Lu, S.Ito, and V.L.Schuster. 2002. Prostaglandin transporter PGT is expressed in cell types that synthesize and release prostanoids. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 282:F1103-F1110.
29. Banu,S.K., J.A.Arosh, P.Chapdelaine, and M.A.Fortier. 2003. Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: a basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:11747-11752.
30. Reid,G., P.Wielinga, N.Zelcer, d.H.van, I, A.Kuil, H.M.de, J.Wijnholds, and P.Borst. 2003. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:9244-9249.
31. Kuehl,F.A., Jr. and J.L.Humes. 1972. Direct evidence for a prostaglandin receptor and its application to prostaglandin measurements (rat-adipocytes-antagonists-analogues-mouse ovary assay). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69:480-484.

32. Kennedy,I., R.A.Coleman, P.P.Humphrey, G.P.Levy, and P.Lumley. 1982. Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification. *Prostaglandins* 24:667-689.
33. Coleman,R.A., S.P.Grix, S.A.Head, J.B.Louittit, A.Mallett, and R.L.Sheldrick. 1994. A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* 47:151-168.
34. Audoly,L. and R.M.Breyer. 1997. The second extracellular loop of the prostaglandin EP3 receptor is an essential determinant of ligand selectivity. *J. Biol. Chem.* 272:13475-13478.
35. Chang,C., M.Negishi, N.Nishigaki, and A.Ichikawa. 1997. Functional interaction of the carboxylic acid group of agonists and the arginine residue of the seventh transmembrane domain of prostaglandin E receptor EP3 subtype. *Biochem. J.* 322 (Pt 2):597-601.
36. Negishi,M., A.Irie, Y.Sugimoto, T.Namba, and A.Ichikawa. 1995. Selective coupling of prostaglandin E receptor EP3D to Gi and Gs through interaction of alpha-carboxylic acid of agonist and arginine residue of seventh transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* 270:16122-16127.
37. Breyer,M.D. and R.M.Breyer. 2000. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 279:F12-F23.
38. Kotani,M., I.Tanaka, Y.Ogawa, T.Usui, K.Mori, A.Ichikawa, S.Narumiya, T.Yoshimi, and K.Nakao. 1995. Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP3 subtype generated by alternative messenger RNA splicing: multiple second messenger systems and tissue-specific distributions. *Mol. Pharmacol.* 48:869-879.
39. Pierce,K.L. and J.W.Regan. 1998. Prostanoid receptor heterogeneity through alternative mRNA splicing. *Life Sci.* 62:1479-1483.
40. Irie,A., Y.Sugimoto, T.Namba, A.Harazono, A.Honda, A.Watabe, M.Negishi, S.Narumiya, and A.Ichikawa. 1993. Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP3 subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Eur. J. Biochem.* 217:313-318.
41. Watabe,A., Y.Sugimoto, A.Honda, A.Irie, T.Namba, M.Negishi, S.Ito, S.Narumiya, and A.Ichikawa. 1993. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J. Biol. Chem.* 268:20175-20178.

42. Katsuyama,M., Y.Sugimoto, K.Morimoto, K.Hasumoto, M.Fukumoto, M.Negishi, and A.Ichikawa. 1997. 'Distinct cellular localization' of the messenger ribonucleic acid for prostaglandin E receptor subtypes in the mouse uterus during pseudopregnancy. *Endocrinology* 138:344-350.
43. Breyer,R.M., C.K.Bagdassarian, S.A.Myers, and M.D.Breyer. 2001. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:661-690.
44. Sugimoto,Y., T.Namba, A.Honda, Y.Hayashi, M.Negishi, A.Ichikawa, and S.Narumiya. 1992. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J. Biol. Chem.* 267:6463-6466.
45. Honda,A., Y.Sugimoto, T.Namba, A.Watabe, A.Irie, M.Negishi, S.Narumiya, and A.Ichikawa. 1993. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. *J. Biol. Chem.* 268:7759-7762.
46. Mao,G.F., J.G.Jin, M.Bastepe, S.Ortiz-Vega, and B.Ashby. 1996. Prostaglandin E2 both stimulates and inhibits adenylyl cyclase on platelets: comparison of effects on cloned EP4 and EP3 prostaglandin receptor subtypes. *Prostaglandins* 52:175-185.
47. Hebert,R.L., H.R.Jacobson, and M.D.Breyer. 1990. PGE2 inhibits AVP-induced water flow in cortical collecting ducts by protein kinase C activation. *Am. J. Physiol* 259:F318-F325.
48. Nakao,A., M.L.Allen, W.K.Sonnenburg, and W.L.Smith. 1989. Regulation of cAMP metabolism by PGE2 in cortical and medullary thick ascending limb of Henle's loop. *Am. J. Physiol* 256:C652-C657.
49. Bos,C.L., D.J.Richel, T.Ritsema, M.P.Peppelenbosch, and H.H.Versteeg. 2004. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:1187-1205.
50. Sonnenburg,W.K., J.H.Zhu, and W.L.Smith. 1990. A prostaglandin E receptor coupled to a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rabbit cortical collecting tubule cells. *J. Biol. Chem.* 265:8479-8483.
51. Burkey,T.H. and J.W.Regan. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase by the human prostaglandin EP3A receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211:152-158.
52. Grantham,J.J. and J.Orloff. 1968. Effect of prostaglandin E1 on the permeability response of the isolated collecting tubule to vasopressin, adenosine 3',5'-monophosphate, and theophylline. *J. Clin. Invest* 47:1154-1161.
53. Dunn,M.J. and V.L.Hood. 1977. Prostaglandins and the kidney. *Am. J. Physiol* 233:169-184.

54. Audoly,L.P., S.L.Tilley, J.Goulet, M.Key, M.Nguyen, J.L.Stock, J.D.McNeish, B.H.Koller, and T.M.Coffman. 1999. Identification of specific EP receptors responsible for the hemodynamic effects of PGE₂. *Am. J. Physiol* 277:H924-H930.
55. Serebryakov,V., S.Zakharenko, V.Snetkov, and K.Takeda. 1994. Effects of prostaglandins E₁ and E₂ on cultured smooth muscle cells and strips of rat aorta. *Prostaglandins* 47:353-365.
56. Qian,Y.M., R.L.Jones, K.M.Chan, A.I.Stock, and J.K.Ho. 1994. Potent contractile actions of prostanoid EP₃-receptor agonists on human isolated pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* 113:369-374.
57. Takeuchi,K., H.Ukawa, S.Kato, O.Furukawa, H.Araki, Y.Sugimoto, A.Ichikawa, F.Ushikubi, and S.Narumiya. 1999. Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E-receptor subtype EP(3). *Gastroenterology* 117:1128-1135.
58. Eglinton, 1963. Isolation and identification of two smooth muscle stimulants from menstrual fluid. *Nature* 200:960.
59. Lau,I.F., S.K.Saksena, and M.C.Chang. 1973. Pregnancy blockade by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis: its reversal by prostaglandins and progesterone in mice. *Prostaglandins* 4:795-803.
60. Kennedy,T.G. 1979. Prostaglandins and increased endometrial vascular permeability resulting from the application of artificial stimulus to the uterus of the rat sensitized for the decidual cell reaction. *Biol. Reprod.* 20:560-566.
61. Racowsky,C. and J.D.Biggers. 1983. Are blastocyst prostaglandins produced endogenously? *Biol. Reprod.* 29:379-388.
62. Biggers,J.D., B.V.Leonov, J.F.Baskar, and J.Fried. 1978. Inhibition of hatching of mouse blastocysts in vitro by prostaglandin antagonists. *Biol. Reprod.* 19:519-533.
63. Chida,S. and L.Mettler. 1989. Effects of indomethacin, prostaglandin E₂ and prostaglandin F₂ alpha on mouse blastocyst attachment and trophoblastic outgrowth in vitro. *Prostaglandins* 37:411-416.
64. Karim,S.M., S.M.Lim, A.Ilancheran, S.S.Ratnam, L.T.Ang, K.H.Ng, T.A.Sinathuray, H.Hutabarat, J.Hanafiah, and P.Simanjuntak. 1982. Induction of labour with prostaglandin E₂ and amniotomy--a multicentre, three dose schedule study in 1533 patients. *Ann. Acad. Med. Singapore* 11:503-507.

-
65. Coggins,K.G., A.Latour, M.S.Nguyen, L.Audoly, T.M.Coffman, and B.H.Koller. 2002. Metabolism of PGE2 by prostaglandin dehydrogenase is essential for remodeling the ductus arteriosus. *Nat. Med.* 8:91-92.
 66. Ferreira,S.H. 1972. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat. New Biol.* 240:200-203.
 67. Taiwo,Y.O. and J.D.Levine. 1988. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia. *Brain Res.* 458:402-406.
 68. Goulet,J.L., A.J.Pace, M.L.Key, R.S.Byrum, M.Nguyen, S.L.Tilley, S.G.Morham, R.Langenhach, J.L.Stock, J.D.McNeish, O.Smithies, T.M.Coffman, and B.H.Koller. 2004. E-prostanoid-3 receptors mediate the proinflammatory actions of prostaglandin E2 in acute cutaneous inflammation. *J. Immunol.* 173:1321-1326.
 69. Milton,A.S. and S.Wendlandt. 1970. A possible role for prostaglandin E1 as a modulator for temperature regulation in the central nervous system of the cat. *J. Physiol* 207:76P-77P.
 70. Ushikubi,F., E.Segi, Y.Sugimoto, T.Murata, T.Matsuoka, T.Kobayashi, H.Hizaki, K.Tuboi, M.Katsuyama, A.Ichikawa, T.Tanaka, N.Yoshida, and S.Narumiya. 1998. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 395:281-284.
 71. Murakami,M., H.Kuwata, Y.Amakasu, S.Shimbara, Y.Nakatani, G.Atsumi, and I.Kudo. 1997. Prostaglandin E2 amplifies cytosolic phospholipase A2- and cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in mouse osteoblastic cells. Enhancement by secretory phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 272:19891-19897.
 72. Collins,D.A. and T.J.Chambers. 1991. Effect of prostaglandins E1, E2, and F2 alpha on osteoclast formation in mouse bone marrow cultures. *J. Bone Miner. Res.* 6:157-164.
 73. Takayama,K., G.Garcia-Cardena, G.K.Sukhova, J.Comander, M.A.Gimbrone, Jr., and P.Libby. 2002. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J. Biol. Chem.* 277:44147-44154.
 74. Betz,M. and B.S.Fox. 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* 146:108-113.
 75. Katsuyama,M., Y.Sugimoto, K.Okano, E.Segi, R.Ikegami, M.Negishi, and A.Ichikawa. 1998. Characterization of the gene for the mouse prostaglandin E receptor subtype EP2: tissue-specific initiation of transcription in the macrophage and the uterus. *Biochem. J.* 330 (Pt 3):1115-1121.

-
76. Humes, J.L., R.J. Bonney, L. Pelus, M.E. Dahlgren, S.J. Sadowski, F.A. Kuehl, Jr., and P. Davies. 1977. Macrophages synthesis and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. *Nature* 269:149-151.
 77. Chang, W.C., S.I. Murota, J. Nakao, and H. Orimo. 1980. Age-related decrease in prostacyclin biosynthetic activity in rat aortic smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* 620:159-166.
 78. Amano, H., I. Hayashi, H. Endo, H. Kitasato, S. Yamashina, T. Maruyama, M. Kobayashi, K. Satoh, M. Narita, Y. Sugimoto, T. Murata, H. Yoshimura, S. Narumiya, and M. Majima. 2003. Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J. Exp. Med.* 197:221-232.
 79. Zieve, P.D. and W.B. Greenough, III. 1969. Adenyl cyclase in human platelets: activity and responsiveness. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35:462-466.
 80. Whittle, B.J., S. Moncada, and J.R. Vane. 1978. Comparison of the effects of prostacyclin (PGI₂), prostaglandin E₁ and D₂ on platelet aggregation in different species. *Prostaglandins* 16:373-388.
 81. Vargaftig, B.B. and M. Chignard. 1975. Substances that increase the cyclic AMP content prevent platelet aggregation and the concurrent release of pharmacologically active substances evoked by arachidonic acid. *Agents Actions* 5:137-144.
 82. Tynan, S.S., N.H. Andersen, M.T. Wills, L.A. Harker, and S.R. Hanson. 1984. On the multiplicity of platelet prostaglandin receptors. II. The use of N-0164 for distinguishing the loci of action for PGI₂, PGD₂, PGE₂ and hydantoin analogs. *Prostaglandins* 27:683-696.
 83. Gray, S.J. and S. Heptinstall. 1991. Interactions between prostaglandin E₂ and inhibitors of platelet aggregation which act through cyclic AMP. *Eur. J. Pharmacol.* 194:63-70.
 84. Fabre, J.E., M. Nguyen, K. Athirakul, K. Coggins, J.D. McNeish, S. Austin, L.K. Parise, G.A. FitzGerald, T.M. Coffman, and B.H. Koller. 2001. Activation of the murine EP₃ receptor for PGE₂ inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation. *J. Clin. Invest* 107:603-610.
 85. Vezza, R., R. Roberti, G.G. Nenci, and P. Gresele. 1993. Prostaglandin E₂ potentiates platelet aggregation by priming protein kinase C. *Blood* 82:2704-2713.
 86. Smith, J.B., C.M. Ingerman, and M.J. Silver. 1976. Platelet prostaglandin production and its implications. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 2:747-753.

87. Wilson,C.H., N.H.Andersen, and S.S.Tynan. 1982. A single platelet aggregometric assay for pro-and antiaggregatory prostanoids. *Prostaglandins Leukot. Med.* 9:415-427.
88. Paul,B.Z., B.Ashby, and S.B.Sheth. 1998. Distribution of prostaglandin IP and EP receptor subtypes and isoforms in platelets and human umbilical artery smooth muscle cells. *Br. J. Haematol.* 102:1204-1211.
89. Ma,H., A.Hara, C.Y.Xiao, Y.Okada, O.Takahata, K.Nakaya, Y.Sugimoto, A.Ichikawa, S.Narumiya, and F.Ushikubi. 2001. Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3). *Circulation* 104:1176-1180.
90. Andersen,N.H., T.L.Eggerman, L.A.Harker, C.H.Wilson, and B.De. 1980. On the multiplicity of platelet prostaglandin receptors. I. Evaluation of competitive antagonism by aggregometry. *Prostaglandins* 19:711-735.
91. Lerea,K.M., J.A.Glomset, and E.G.Krebs. 1987. Agents that elevate cAMP levels in platelets decrease thrombin binding. *J. Biol. Chem.* 262:282-288.
92. Watson,S.P., R.T.McConnell, and E.G.Lapetina. 1984. The rapid formation of inositol phosphates in human platelets by thrombin is inhibited by prostacyclin. *J. Biol. Chem.* 259:13199-13203.
93. Nakamura,K., M.Kimura, and A.Aviv. 1995. Role of cyclic nucleotides in store-mediated external Ca²⁺ entry in human platelets. *Biochem. J.* 310 (Pt 1):263-269.
94. Hettasch,J.M. and G.C.Le Breton. 1987. Modulation of Ca²⁺ fluxes in isolated platelet vesicles: effects of cAMP-dependent protein kinase and protein kinase inhibitor on Ca²⁺ sequestration and release. *Biochim. Biophys. Acta* 931:49-58.
95. van,W.G. and J.W.Akkerman. 1991. Protein kinase C and cyclic AMP regulate reversible exposure of binding sites for fibrinogen on the glycoprotein IIB-IIIA complex of human platelets. *Biochem. J.* 273(Pt 1):115-120.
96. Suzuki,T., A.Hayashi, and S.Takano. 1982. Effects of prostaglandins on thrombus formation in mesenteric arterioles of rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 137:65-71.
97. Ma,H., A.Hara, C.Y.Xiao, Y.Okada, O.Takahata, K.Nakaya, Y.Sugimoto, A.Ichikawa, S.Narumiya, and F.Ushikubi. 2001. Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3). *Circulation* 104:1176-1180.

-
98. Léger P., Pathak A., Hajji L., Faivre-Carrere C., and Boccalon H. La maladie de Buerger ou thromboangéite oblitérante. *Ann.Cardiol.Angiol.* 50, 82-89. 2001.
Ref Type: Generic
 99. Sanghavi,P., A.Paramesh, A.Dwivedi, T.Markova, and T.Phan. 2001. Mesenteric arterial thrombosis as a complication of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 46:2344-2346.
 100. Fleming,E.F., K.Athirakul, M.I.Oliverio, M.Key, J.Goulet, B.H.Koller, and T.M.Coffman. 1998. Urinary concentrating function in mice lacking EP3 receptors for prostaglandin E2. *Am. J. Physiol* 275:F955-F961.
 101. Moncada,S., R.M.Palmer, and E.A.Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142.
 102. Moncada,S., R.Gryglewski, S.Bunting, and J.R.Vane. 1976. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665.
 103. Cheng,Y., S.C.Austin, B.Rocca, B.H.Koller, T.M.Coffman, T.Grosser, J.A.Lawson, and G.A.FitzGerald. 2002. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science* 296:539-541.
 104. Furchgott,R.F. and J.V.Zawadzki. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
 105. Ignarro,L.J., G.M.Buga, K.S.Wood, R.E.Byrns, and G.Chaudhuri. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:9265-9269.
 106. Ignarro,L.J. 1990. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 16:477-483.
 107. Palmer,R.M., D.S.Ashton, and S.Moncada. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666.
 108. Nathan,C. and Q.W.Xie. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269:13725-13728.
 109. Schini-Kerth,V.B. and P.M.Vanhoutte. 1995. Nitric oxide synthases in vascular cells. *Exp. Physiol* 80:885-905.

-
110. Davis, M.E., I.M. Grumbach, T. Fukai, A. Cutchins, and D.G. Harrison. 2004. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J. Biol. Chem.* 279:163-168.
 111. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada. 1987. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br. J. Pharmacol.* 92:181-187.
 112. Kader, K.N., R. Akella, N.P. Ziats, L.A. Lakey, H. Harasaki, J.P. Ranieri, and R.V. Bellamkonda. 2000. eNOS-overexpressing endothelial cells inhibit platelet aggregation and smooth muscle cell proliferation in vitro. *Tissue Eng* 6:241-251.
 113. Heeringa, P., G.H. van, Y. Itoh-Lindstrom, N. Maeda, R.J. Falk, K.J. Assmann, C.G. Kallenberg, and J.C. Jennette. 2000. Lack of endothelial nitric oxide synthase aggravates murine accelerated anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 156:879-888.
 114. Freedman, J.E., R. Sauter, E.M. Battinelli, K. Ault, C. Knowles, P.L. Huang, and J. Loscalzo. 1999. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ. Res.* 84:1416-1421.
 115. de Graaf, J.C., J.D. Banga, S. Moncada, R.M. Palmer, P.G. de Groot, and J.J. Sixma. 1992. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 85:2284-2290.
 116. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada. 1987. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148:1482-1489.
 117. Wade, M.L. and F.A. Fitzpatrick. 1997. Nitric oxide modulates the activity of the hemoproteins prostaglandin I₂ synthase and thromboxane A₂ synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 347:174-180.
 118. Moncada, S., A.G. Herman, E.A. Higgs, and J.R. Vane. 1977. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb. Res.* 11:323-344.
 119. Weksler, B.B., A.J. Marcus, and E.A. Jaffe. 1977. Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74:3922-3926.

120. Baenziger,N.L., P.R.Becherer, and P.W.Majerus. 1979. Characterization of prostacyclin synthesis in cultured human arterial smooth muscle cells, venous endothelial cells and skin fibroblasts. *Cell* 16:967-974.
121. Czervionke,R.L., J.B.Smith, G.L.Fry, J.C.Hoak, and D.L.Haycraft. 1979. Inhibition of prostacyclin by treatment of endothelium with aspirin. Correlation with platelet adherence. *J. Clin. Invest* 63:1089-1092.
122. Habib,A., C.Creminon, Y.Frobert, J.Grassi, P.Pradelles, and J.Maclouf. 1993. Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 268:23448-23454.
123. Rimarachin,J.A., J.A.Jacobson, P.Szabo, J.Maclouf, C.Creminon, and B.B.Weksler. 1994. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb.* 14:1021-1031.
124. Creminon,C., A.Habib, J.Maclouf, P.Pradelles, J.Grassi, and Y.Frobert. 1995. Differential measurement of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase expression in human umbilical vein endothelial cells using specific immunometric enzyme immunoassays. *Biochim. Biophys. Acta* 1254:341-348.
125. Topper,J.N., J.Cai, D.Falb, and M.A.Gimbrone, Jr. 1996. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:10417-10422.
126. McAdam,B.F., F.Catella-Lawson, I.A.Mardini, S.Kapoor, J.A.Lawson, and G.A.FitzGerald. 1999. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:272-277.
127. Namba,T., H.Oida, Y.Sugimoto, A.Kakizuka, M.Negishi, A.Ichikawa, and S.Narumiya. 1994. cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J. Biol. Chem.* 269:9986-9992.
128. Miggin,S.M. and B.T.Kinsella. 2002. Investigation of the mechanisms of G protein: effector coupling by the human and mouse prostacyclin receptors. Identification of critical species-dependent differences. *J. Biol. Chem.* 277:27053-27064.
129. Hopkins,N.K. and R.R.Gorman. 1981. Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. *J. Clin. Invest* 67:540-546.

-
130. Tateson, J.E., S.Moncada, and J.R.Vane. 1977. Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins* 13:389-397.
 131. Radomski, M.W., R.M.Palmer, and S.Moncada. 1987. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 92:639-646.
 132. Bourgain, R.H. 1978. Inhibition of PGI₂ (prostacyclin) synthesis in the arterial wall enhances the formation of white platelet thrombi in vivo. *Haemostasis* 7:252-255.
 133. Czervionke, R.L., J.C.Hoak, and G.L.Fry. 1978. Effect of aspirin on thrombin-induced adherence of platelets to cultured cells from the blood vessel wall. *J. Clin. Invest* 62:847-856.
 134. Murata, T., F.Ushikubi, T.Matsuoka, M.Hirata, A.Yamasaki, Y.Sugimoto, A.Ichikawa, Y.Aze, T.Tanaka, N.Yoshida, A.Ueno, S.Oh-ishi, and S.Narumiya. 1997. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 388:678-682.
 135. Osanai, T., N.Fujita, N.Fujiwara, T.Nakano, K.Takahashi, W.Guan, and K.Okumura. 2000. Cross talk of shear-induced production of prostacyclin and nitric oxide in endothelial cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 278:H233-H238.
 136. Italiano, J.E., Jr., P.Lecine, R.A.Shivdasani, and J.H.Hartwig. 1999. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol.* 147:1299-1312.
 137. Patel, S.R., J.H.Hartwig, and J.E.Italiano, Jr. 2005. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest* 115:3348-3354.
 138. Piper, P.J. and J.R.Vane. 1969. Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Nature* 223:29-35.
 139. Svensson, J., M.Hamberg, and B.Samuelsson. 1975. Prostaglandin endoperoxides IX. Characterization of rabbit aorta contracting substance (RCS) from guinea pig lung and human platelets. *Acta Physiol Scand.* 94:222-228.
 140. Hamberg, M., J.Svensson, and B.Samuelsson. 1975. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72:2994-2998.

141. Hirata,M., Y.Hayashi, F.Ushikubi, Y.Yokota, R.Kageyama, S.Nakanishi, and S.Narumiya. 1991. Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor. *Nature* 349:617-620.
142. Brass,L.F., C.C.Shaller, and E.J.Belmonte. 1987. Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *J. Clin. Invest* 79:1269-1275.
143. Le Breton,G.C., D.L.Venton, S.E.Enke, and P.V.Halushka. 1979. 13-Azaprostanoic acid: a specific antagonist of the human blood platelet thromboxane/endoperoxide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76:4097-4101.
144. Fitzpatrick,F.A., G.L.Bundy, R.R.Gorman, and T.Honohan. 1978. 9,11-epoxyiminoprostas-5,13-dienoic acid is a thromboxane A2 antagonist in human platelets. *Nature* 275:764-766.
145. Thomas,D.W., R.B.Mannon, P.J.Mannon, A.Latour, J.A.Oliver, M.Hoffman, O.Smithies, B.H.Koller, and T.M.Coffman. 1998. Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2. *J. Clin. Invest* 102:1994-2001.
146. Stevens,D.E., J.H.Joist, and S.P.Sutera. 1980. Role of platelet-prostaglandin synthesis in shear-induced platelet alterations. *Blood* 56:753-758.
147. Balligand,J.L., D.Ungureanu-Longrois, W.W.Simmons, L.Kobzik, C.J.Lowenstein, S.Lamas, R.A.Kelly, T.W.Smith, and T.Michel. 1995. Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 beta and IFN-gamma. *Am. J. Physiol* 268:H1293-H1303.
148. Griendling,K.K., D.Sorescu, and M.Ushio-Fukai. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 86:494-501.
149. Vasquez-Vivar,J., B.Kalyanaraman, P.Martasek, N.Hogg, B.S.Masters, H.Karoui, P.Tordo, and K.A.Pritchard, Jr. 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:9220-9225.
150. Landmesser,U., B.Hornig, and H.Drexler. 2004. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 109:II27-II33.
151. Landmesser,U., S.Dikalov, S.R.Price, L.McCann, T.Fukai, S.M.Holland, W.E.Mitch, and D.G.Harrison. 2003. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest* 111:1201-1209.

-
152. Lee,S.H. and I.A.Blair. 2001. Oxidative DNA damage and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 11:148-155.
153. Kunsch,C. and R.M.Medford. 1999. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ. Res.* 85:753-766.
154. Marui,N., M.K.Offermann, R.Swerlick, C.Kunsch, C.A.Rosen, M.Ahmad, R.W.Alexander, and R.M.Medford. 1993. 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* 92:1866-1874.
155. De,C.R., P.Libby, H.B.Peng, V.J.Thannickal, T.B.Rajavashisth, M.A.Gimbrone, Jr., W.S.Shin, and J.K.Liao. 1995. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J. Clin. Invest* 96:60-68.
156. Satriano,J.A., M.Shuldiner, K.Hora, Y.Xing, Z.Shan, and D.Schlondorff. 1993. Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J. Clin. Invest* 92:1564-1571.
157. Peng,H.B., P.Libby, and J.K.Liao. 1995. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 270:14214-14219.
158. Iafrati,M.D., O.Vitseva, K.Tanriverdi, P.Blair, S.Rex, S.Chakrabarti, S.Varghese, and J.E.Freedman. 2005. Compensatory mechanisms influence hemostasis in setting of eNOS deficiency. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 288:H1627-H1632.
159. Ozuyaman,B., A.Godecke, S.Kusters, E.Kirchhoff, R.E.Scharf, and J.Schrader. 2005. Endothelial nitric oxide synthase plays a minor role in inhibition of arterial thrombus formation. *Thromb. Haemost.* 93:1161-1167.
160. Loscalzo,J. 2001. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ. Res.* 88:756-762.
161. Michelson,A.D., S.E.Benoit, M.I.Furman, W.L.Breckwoldt, M.J.Rohrer, M.R.Barnard, and J.Loscalzo. 1996. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am. J. Physiol* 270:H1640-H1648.

-
162. Sun,D., H.Liu, C.Yan, A.Jacobson, C.Ojaimi, A.Huang, and G.Kaley. 2006. COX-2 contributes to the maintenance of flow-induced dilation in arterioles of eNOS-knockout mice. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 291:H1429-H1435.
 163. Cunningham,K.S. and A.I.Gotlieb. 2005. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* 85:9-23.
 164. Brotherton,A.F. and J.C.Hoak. 1982. Role of Ca²⁺ and cyclic AMP in the regulation of the production of prostacyclin by the vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79:495-499.
 165. Riedo,F.X., R.S.Munford, W.B.Campbell, J.S.Reisch, K.R.Chien, and R.D.Gerard. 1990. Deacylated lipopolysaccharide inhibits plasminogen activator inhibitor-1, prostacyclin, and prostaglandin E2 induction by lipopolysaccharide but not by tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 144:3506-3512.
 166. Nawroth,P.P., D.M.Stern, K.L.Kaplan, and H.L.Nossel. 1984. Prostacyclin production by perturbed bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood* 64:801-806.
 167. FitzGerald,G.A., A.K.Pedersen, and C.Patrono. 1983. Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation* 67:1174-1177.
 168. FitzGerald,G.A., B.Smith, A.K.Pedersen, and A.R.Brash. 1984. Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N. Engl. J. Med.* 310:1065-1068.
 169. Gawaz,M., F.J.Neumann, T.Dickfeld, A.Reininger, H.Adelsberger, A.Gebhardt, and A.Schomig. 1997. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 96:1809-1818.
 170. Bombeli,T., B.R.Schwartz, and J.M.Harlan. 1998. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha. *J. Exp. Med.* 187:329-339.
 171. Etingin,O.R., R.L.Silverstein, and D.P.Hajjar. 1993. von Willebrand factor mediates platelet adhesion to virally infected endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:5153-5156.
 172. Conway,E.M., R.Bach, R.D.Rosenberg, and W.H.Konigsberg. 1989. Tumor necrosis factor enhances expression of tissue factor mRNA in endothelial cells. *Thromb. Res.* 53:231-241.

-
173. Marmur, J.D., M. Rossikhina, A. Guha, B. Fyfe, V. Friedrich, M. Mendlowitz, Y. Nemerson, and M.B. Taubman. 1993. Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. *J. Clin. Invest* 91:2253-2259.
174. Key, N.S., G.M. Vercellotti, J.C. Winkelmann, C.F. Moldow, J.L. Goodman, N.L. Esmon, C.T. Esmon, and H.S. Jacob. 1990. Infection of vascular endothelial cells with herpes simplex virus enhances tissue factor activity and reduces thrombomodulin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:7095-7099.
175. Etingin, O.R., R.L. Silverstein, H.M. Friedman, and D.P. Hajjar. 1990. Viral activation of the coagulation cascade: molecular interactions at the surface of infected endothelial cells. *Cell* 61:657-662.
176. Visser, M.R., P.B. Tracy, G.M. Vercellotti, J.L. Goodman, J.G. White, and H.S. Jacob. 1988. Enhanced thrombin generation and platelet binding on herpes simplex virus-infected endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85:8227-8230.
177. Frenette, P.S., R.C. Johnson, R.O. Hynes, and D.D. Wagner. 1995. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:7450-7454.
178. Frenette, P.S., C. Moyna, D.W. Hartwell, J.B. Lowe, R.O. Hynes, and D.D. Wagner. 1998. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 91:1318-1324.
179. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May. 2005. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest* 115:3378-3384.
180. Ruggeri, Z.M. 2006. Platelet interactions with vessel wall components during thrombogenesis. *Blood Cells Mol. Dis.* 36:145-147.
181. Massberg, S., G. Enders, R. Leiderer, S. Eisenmenger, D. Vestweber, F. Krombach, and K. Messmer. 1998. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 92:507-515.
182. Romo, G.M., J.F. Dong, A.J. Schade, E.E. Gardiner, G.S. Kansas, C.Q. Li, L.V. McIntire, M.C. Berndt, and J.A. Lopez. 1999. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J. Exp. Med.* 190:803-814.
183. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan. 1998. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for

- endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J. Exp. Med.* 187:329-339.
184. Gawaz, M. 2004. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc. Res.* 61:498-511.
185. Andre, P., K.S. Prasad, C.V. Denis, M. He, J.M. Papalia, R.O. Hynes, D.R. Phillips, and D.D. Wagner. 2002. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat. Med.* 8:247-252.
186. Davey, M.G. and E.F. Luscher. 1967. Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets. *Nature* 216:857-858.
187. Coughlin, S.R. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258-264.
188. Clemetson, K.J. and J.M. Clemetson. 2001. Platelet collagen receptors. *Thromb. Haemost.* 86:189-197.
189. Nieswandt, B., C. Brakebusch, W. Bergmeier, V. Schulte, D. Bouvard, R. Mokhtari-Nejad, T. Lindhout, J.W. Heemskerk, H. Zirngibl, and R. Fassler. 2001. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J.* 20:2120-2130.
190. Massberg, S., M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlnhofer, U. Heinzmann, and B. Nieswandt. 2003. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J. Exp. Med.* 197:41-49.
191. Holtkotter, O., B. Nieswandt, N. Smyth, W. Muller, M. Hafner, V. Schulte, T. Krieg, and B. Eckes. 2002. Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J. Biol. Chem.* 277:10789-10794.
192. Sarratt, K.L., H. Chen, M.M. Zutter, S.A. Santoro, D.A. Hammer, and M.L. Kahn. 2005. GPVI and alpha2beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood* 106:1268-1277.
193. Fabre, J.E., M. Nguyen, A. Latour, J.A. Keifer, L.P. Audoly, T.M. Coffman, and B.H. Koller. 1999. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat. Med.* 5:1199-1202.

194. Andre,P., S.M.Delaney, T.LaRocca, D.Vincent, F.DeGuzman, M.Jurek, B.Koller, D.R.Phillips, and P.B.Conley. 2003. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J. Clin. Invest* 112:398-406.
195. Koutroubakis,I.E., A.Theodoropoulou, C.Xidakis, A.Sfiridaki, G.Notas, G.Kolios, and E.A.Kouroumalis. 2004. Association between enhanced soluble CD40 ligand and prothrombotic state in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 16:1147-1152.
196. Fagerstam,J.P. and P.A.Whiss. 2006. Higher platelet P-selectin in male patients with inflammatory bowel disease compared to healthy males. *World J. Gastroenterol.* 12:1270-1272.
197. von der Thusen,J.H., T.J.van Berkel, and E.A.Biessen. 2001. Induction of rapid atherogenesis by perivascular carotid collar placement in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 103:1164-1170.
198. Kurz,K.D., B.W.Main, and G.E.Sandusky. 1990. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb. Res.* 60:269-280.
199. Smith,J.B., C.Ingerman, J.J.Kocsis, and M.J.Silver. 1973. Formation of prostaglandins during the aggregation of human blood platelets. *J. Clin. Invest* 52:965-969.
200. Li,R., K.P.Mouillesseaux, D.Montoya, D.Cruz, N.Gharavi, M.Dun, L.Koroniak, and J.A.Berliner. 2006. Identification of prostaglandin E2 receptor subtype 2 as a receptor activated by OxPAPC. *Circ. Res.* 98:642-650.
201. Cheng,Y., M.Wang, Y.Yu, J.Lawson, C.D.Funk, and G.A.FitzGerald. 2006. Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *J. Clin. Invest* 116:1391-1399.
202. Schwenke,D.C. and T.E.Carew. 1989. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis* 9:908-918.
203. Schwenke,D.C. and T.E.Carew. 1989. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis* 9:895-907.
204. Cai,H. and D.G.Harrison. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87:840-844.

-
205. Nerem,R.M. 1992. Vascular fluid mechanics, the arterial wall, and atherosclerosis. *J. Biomech. Eng* 114:274-282.
206. Rosenfeld,M.E. 1996. Cellular mechanisms in the development of atherosclerosis. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 30 Suppl:1-11.
207. Ignarro,L.J. and C.Napoli. 2004. Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 6:281-287.
208. Vallance,P. and N.Chan. 2001. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 85:342-350.
209. Khalil,M.F., W.D.Wagner, and I.J.Goldberg. 2004. Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:2211-2218.
210. Boren,J., M.Gustafsson, K.Skalen, C.Flood, and T.L.Innerarity. 2000. Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 11:451-456.
211. Palinski,W., M.E.Rosenfeld, S.Yla-Herttuala, G.C.Gurtner, S.S.Socher, S.W.Butler, S.Parthasarathy, T.E.Carew, D.Steinberg, and J.L.Witztum. 1989. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:1372-1376.
212. Leitinger,N. 2003. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 14:421-430.
213. Jonasson,L., J.Holm, O.Skalli, G.Bondjers, and G.K.Hansson. 1986. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6:131-138.
214. Berliner,J.A. and A.D.Watson. 2005. A role for oxidized phospholipids in atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 353:9-11.
215. Boring,L., J.Gosling, M.Cleary, and I.F.Charo. 1998. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394:894-897.
216. Gu,L., Y.Okada, S.K.Clinton, C.Gerard, G.K.Sukhova, P.Libby, and B.J.Rollins. 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* 2:275-281.
217. Lehr,H.A., A.M.Olofsson, T.E.Carew, P.Vajkoczy, U.H.von Andrian, C.Hubner, M.C.Berndt, D.Steinberg, K.Messmer, and K.E.Arfors. 1994. P-selectin mediates the

-
- interaction of circulating leukocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein in vivo. *Lab Invest* 71:380-386.
218. Li,H., M.I.Cybulsky, M.A.Gimbrone, Jr., and P.Libby. 1993. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler. Thromb.* 13:197-204.
219. Takei,A., Y.Huang, and M.F.Lopes-Virella. 2001. Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. *Atherosclerosis* 154:79-86.
220. Amberger,A., C.Maczek, G.Jurgens, D.Michaelis, G.Schett, K.Trieb, T.Eberl, S.Jindal, Q.Xu, and G.Wick. 1997. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. *Cell Stress. Chaperones.* 2:94-103.
221. Khan,B.V., S.S.Parthasarathy, R.W.Alexander, and R.M.Medford. 1995. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest* 95:1262-1270.
222. Calara,F., P.Dimayuga, A.Niemann, J.Thyberg, U.Diczfalusy, J.L.Witztum, W.Palinski, P.K.Shah, B.Cercek, J.Nilsson, and J.Regstrom. 1998. An animal model to study local oxidation of LDL and its biological effects in the arterial wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:884-893.
223. Eriksson,E.E., X.Xie, J.Werr, P.Thoren, and L.Lindbom. 2001. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J. Exp. Med.* 194:205-218.
224. Ross,R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340:115-126.
225. Libby,P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874.
226. Steinberg,D. and J.L.Witztum. 2002. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 105:2107-2111.
227. Boullier,A., D.A.Bird, M.K.Chang, E.A.Dennis, P.Friedman, K.Gillotre-Taylor, S.Horkko, W.Palinski, O.Quehenberger, P.Shaw, D.Steinberg, V.Terpstra, and J.L.Witztum. 2001. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 947:214-222.

-
228. Hansson,G.K. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352:1685-1695.
229. Chang,M.K., C.Bergmark, A.Laurila, S.Horkko, K.H.Han, P.Friedman, E.A.Dennis, and J.L.Witztum. 1999. Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:6353-6358.
230. Hansson,G.K., J.Holm, and L.Jonasson. 1989. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am. J. Pathol.* 135:169-175.
231. Gupta,S., A.M.Pablo, X.Jiang, N.Wang, A.R.Tall, and C.Schindler. 1997. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J. Clin. Invest* 99:2752-2761.
232. Hansson,G.K. 2001. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1876-1890.
233. Frostegard,J., A.K.Ulfgren, P.Nyberg, U.Hedin, J.Swedenborg, U.Andersson, and G.K.Hansson. 1999. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 145:33-43.
234. Mallat,Z., H.it-Oufella, and A.Tedgui. 2005. Regulatory T cell responses: potential role in the control of atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 16:518-524.
235. Mallat,Z., A.Gojova, V.Brun, B.Esposito, N.Fournier, F.Cottrez, A.Tedgui, and H.Groux. 2003. Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 108:1232-1237.
236. it-Oufella,H., B.L.Salomon, S.Potteaux, A.K.Robertson, P.Gourdy, J.Zoll, R.Merval, B.Esposito, J.L.Cohen, S.Fisson, R.A.Flavell, G.K.Hansson, D.Klatzmann, A.Tedgui, and Z.Mallat. 2006. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat. Med.* 12:178-180.
237. Kohno,M., K.Yokokawa, K.Yasunari, M.Minami, H.Kano, T.Hanehira, and J.Yoshikawa. 1998. Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cell migration. *Circulation* 98:353-359.

-
238. Brizzi,M.F., L.Formato, P.Dentelli, A.Rosso, M.Pavan, G.Garbarino, M.Pegoraro, G.Camussi, and L.Pegoraro. 2001. Interleukin-3 stimulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells: a potential role in atherogenesis. *Circulation* 103:549-554.
239. Miyagawa,J., S.Higashiyama, S.Kawata, Y.Inui, S.Tamura, K.Yamamoto, M.Nishida, T.Nakamura, S.Yamashita, Y.Matsuzawa, and . 1995. Localization of heparin-binding EGF-like growth factor in the smooth muscle cells and macrophages of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest* 95:404-411.
240. Dardik,A., A.Yamashita, F.Aziz, H.Asada, and B.E.Sumpio. 2005. Shear stress-stimulated endothelial cells induce smooth muscle cell chemotaxis via platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1alpha. *J. Vasc. Surg.* 41:321-331.
241. Davies,M.J. 1997. The composition of coronary-artery plaques. *N. Engl. J. Med.* 336:1312-1314.
242. Bennett,M.R., G.I.Evan, and S.M.Schwartz. 1995. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest* 95:2266-2274.
243. Fitzpatrick,L.A., A.Severson, W.D.Edwards, and R.T.Ingram. 1994. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J. Clin. Invest* 94:1597-1604.
244. O'Brien,E.R., M.R.Garvin, D.K.Stewart, T.Hinohara, J.B.Simpson, S.M.Schwartz, and C.M.Giachelli. 1994. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb.* 14:1648-1656.
245. Ikeda,T., T.Shirasawa, Y.Esaki, S.Yoshiki, and K.Hirokawa. 1993. Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. *J. Clin. Invest* 92:2814-2820.
246. Hirota,S., M.Imakita, K.Kohri, A.Ito, E.Morii, S.Adachi, H.M.Kim, Y.Kitamura, C.Yutani, and S.Nomura. 1993. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am. J. Pathol.* 143:1003-1008.

-
247. Liaw,L., M.Almeida, C.E.Hart, S.M.Schwartz, and C.M.Giachelli. 1994. Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ. Res.* 74:214-224.
248. Fuster,V., P.R.Moreno, Z.A.Fayad, R.Corti, and J.J.Badimon. 2005. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46:937-954.
249. Leary. *Am.J.Heart* . 1934.
250. Chapman,I. 1965. Morphogenesis of occluding coronary artery thrombosis. *Arch. Pathol.* 80:256-261.
251. Friedman,M. and G.J.Van den Bovenkamp. 1966. The pathogenesis of a coronary thrombus. *Am. J. Pathol.* 48:19-44.
252. Davies,M.J. and A.C.Thomas. 1985. Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br. Heart J.* 53:363-373.
253. Arbustini,E., M.Grasso, M.Diegoli, A.Pucci, M.Bramerio, D.Ardissino, L.Angoli, S.S.de, E.Bramucci, A.Mussini, and . 1991. Coronary atherosclerotic plaques with and without thrombus in ischemic heart syndromes: a morphologic, immunohistochemical, and biochemical study. *Am. J. Cardiol.* 68:36B-50B.
254. Kragel,A.H., S.G.Reddy, J.T.Wittes, and W.C.Roberts. 1989. Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. *Circulation* 80:1747-1756.
255. Bassiouny,H.S., H.Davis, N.Massawa, B.L.Gewertz, S.Glagov, and C.K.Zarins. 1989. Critical carotid stenoses: morphologic and chemical similarity between symptomatic and asymptomatic plaques. *J. Vasc. Surg.* 9:202-212.
256. Fuster,V., L.Badimon, J.J.Badimon, and J.H.Chesebro. 1992. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N. Engl. J. Med.* 326:242-250.
257. Fuster,V., L.Badimon, J.J.Badimon, and J.H.Chesebro. 1992. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N. Engl. J. Med.* 326:310-318.
258. Mann,J.M. and M.J.Davies. 1996. Vulnerable plaque. Relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation* 94:928-931.

-
259. Shah,P.K. 2003. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41:15S-22S.
260. Schaar,J.A., J.E.Muller, E.Falk, R.Virmani, V.Fuster, P.W.Serruys, A.Colombo, C.Stefanadis, C.S.Ward, P.R.Moreno, A.Maseri, and A.F.van der Steen. 2004. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque, June 17 and 18, 2003, Santorini, Greece. *Eur. Heart J.* 25:1077-1082.
261. Kockx,M.M., G.R.De Meyer, J.Muhring, W.Jacob, H.Bult, and A.G.Herman. 1998. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 97:2307-2315.
262. Bauriedel,G., R.Hutter, U.Welsch, R.Bach, H.Sievert, and B.Luderitz. 1999. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc. Res.* 41:480-488.
263. Mallat,Z., B.Hugel, J.Ohan, G.Leseche, J.M.Freyssinet, and A.Tedgui. 1999. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 99:348-353.
264. Kockx,M.M. and A.G.Herman. 2000. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc. Res.* 45:736-746.
265. Littlewood,T.D. and M.R.Bennett. 2003. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 14:469-475.
266. Geng,Y.J. and P.Libby. 2002. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:1370-1380.
267. Tedgui,A. and Z.Mallat. 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 86:515-581.
268. Polverini,P.J., P.S.Cotran, M.A.Gimbrone, Jr., and E.R.Unanue. 1977. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269:804-806.
269. Moulton,K.S., K.Vakili, D.Zurakowski, M.Soliman, C.Butterfield, E.Sylvin, K.M.Lo, S.Gillies, K.Javaherian, and J.Folkman. 2003. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:4736-4741.

-
270. Fleiner, M., M. Kummer, M. Mirlacher, G. Sauter, G. Cathomas, R. Krapf, and B. C. Biedermann. 2004. Arterial neovascularization and inflammation in vulnerable patients: early and late signs of symptomatic atherosclerosis. *Circulation* 110:2843-2850.
271. Virmani, R., F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. V. Finn, H. K. Gold, T. N. Tulenko, S. P. Wrenn, and J. Narula. 2005. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25:2054-2061.
272. Kolodgie, F. D., H. K. Gold, A. P. Burke, D. R. Fowler, H. S. Kruth, D. K. Weber, A. Farb, L. J. Guerrero, M. Hayase, R. Kutys, J. Narula, A. V. Finn, and R. Virmani. 2003. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N. Engl. J. Med.* 349:2316-2325.
273. Galis, Z. S., G. K. Sukhova, R. Kranzhofer, S. Clark, and P. Libby. 1995. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:402-406.
274. Henney, A. M., P. R. Wakeley, M. J. Davies, K. Foster, R. Hembry, G. Murphy, and S. Humphries. 1991. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:8154-8158.
275. Mach, F., U. Schonbeck, J. Y. Bonnefoy, J. S. Pober, and P. Libby. 1997. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 96:396-399.
276. Schonbeck, U., F. Mach, G. K. Sukhova, E. Atkinson, E. Levesque, M. Herman, P. Graber, P. Basset, and P. Libby. 1999. Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 189:843-853.
277. Wesley, R. B., X. Meng, D. Godin, and Z. S. Galis. 1998. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:432-440.
278. Galis, Z. S., G. K. Sukhova, M. W. Lark, and P. Libby. 1994. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest* 94:2493-2503.
279. Shah, P. K., E. Falk, J. J. Badimon, A. Fernandez-Ortiz, A. Mailhac, G. Villareal-Levy, J. T. Fallon, J. Regnstrom, and V. Fuster. 1995. Human monocyte-derived macrophages induce collagen

- breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 92:1565-1569.
280. Brown,D.L., M.S.Hibbs, M.Kearney, C.Loushin, and J.M.Isner. 1995. Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation* 91:2125-2131.
281. Davies,M.J., P.D.Richardson, N.Woolf, D.R.Katz, and J.Mann. 1993. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.* 69:377-381.
282. Stone,P.H., A.U.Coskun, Y.Yeghiazarians, S.Kinlay, J.J.Popma, R.E.Kuntz, and C.L.Feldman. 2003. Prediction of sites of coronary atherosclerosis progression: In vivo profiling of endothelial shear stress, lumen, and outer vessel wall characteristics to predict vascular behavior. *Curr. Opin. Cardiol.* 18:458-470.
283. Ambrose,J.A. and C.E.Hjemdahl-Monsen. 1987. Arteriographic anatomy and mechanisms of myocardial ischemia in unstable angina. *J. Am. Coll. Cardiol.* 9:1397-1402.
284. Tricot,O., Z.Mallat, C.Heymes, J.Belmin, G.Leseche, and A.Tedgui. 2000. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 101:2450-2453.
285. van Zanten,G.H., G.S.de, P.J.Slootweg, H.F.Heijnen, T.M.Connolly, P.G.de Groot, and J.J.Sixma. 1994. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J. Clin. Invest* 93:615-632.
286. Penz,S., A.J.Reininger, R.Brandl, P.Goyal, T.Rabie, I.Bernlochner, E.Rother, C.Goetz, B.Engelmann, P.A.Smethurst, W.H.Ouwehand, R.Farndale, B.Nieswandt, and W.Siess. 2005. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J.* 19:898-909.
287. Marmur,J.D., S.V.Thiruvikraman, B.S.Fyfe, A.Guha, S.K.Sharma, J.A.Ambrose, J.T.Fallon, Y.Nemerson, and M.B.Taubman. 1996. Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. *Circulation* 94:1226-1232.
288. Ananyeva,N.M., D.V.Kouiavskaia, M.Shima, and E.L.Saenko. 2002. Intrinsic pathway of blood coagulation contributes to thrombogenicity of atherosclerotic plaque. *Blood* 99:4475-4485.

-
289. Wilcox, J.N., K.M. Smith, S.M. Schwartz, and D. Gordon. 1989. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:2839-2843.
290. Annex, B.H., S.M. Denning, K.M. Channon, M.H. Sketch, Jr., R.S. Stack, J.H. Morrissey, and K.G. Peters. 1995. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. *Circulation* 91:619-622.
291. Toschi, V., R. Gallo, M. Lettino, J.T. Fallon, S.D. Gertz, A. Fernandez-Ortiz, J.H. Chesebro, L. Badimon, Y. Nemerson, V. Fuster, and J.J. Badimon. 1997. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 95:594-599.
292. Moreno, P.R., V.H. Bernardi, J. Lopez-Cuellar, A.M. Murcia, I.F. Palacios, H.K. Gold, R. Mehran, S.K. Sharma, Y. Nemerson, V. Fuster, and J.T. Fallon. 1996. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 94:3090-3097.
293. Brand, K., C.L. Banka, N. Mackman, R.A. Terkeltaub, S.T. Fan, and L.K. Curtiss. 1994. Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes. *Arterioscler. Thromb.* 14:790-797.
294. Aikawa, M., S.J. Voglic, S. Sugiyama, E. Rabkin, M.B. Taubman, J.T. Fallon, and P. Libby. 1999. Dietary lipid lowering reduces tissue factor expression in rabbit atheroma. *Circulation* 100:1215-1222.
295. Morel, O., F. Toti, B. Bakouboula, L. Grunebaum, and J.M. Freyssinet. 2006. Procoagulant microparticles: 'criminal partners' in atherothrombosis and deleterious cellular exchanges. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 35:15-22.
296. Badimon, J.J., M. Lettino, V. Toschi, V. Fuster, M. Berrozpe, J.H. Chesebro, and L. Badimon. 1999. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 99:1780-1787.
297. Kaikita, K., M. Takeya, H. Ogawa, H. Suefuji, H. Yasue, and K. Takahashi. 1999. Co-localization of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in coronary atherosclerosis. *J. Pathol.* 188:180-188.

-
298. Siess,W., K.J.Zangl, M.Essler, M.Bauer, R.Brandl, C.Corrinrh, R.Bittman, G.Tigyi, and M.Aepfelbacher. 1999. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:6931-6936.
299. Weidtmann,A., R.Scheithe, N.Hrboticky, A.Pietsch, R.Lorenz, and W.Siess. 1995. Mildly oxidized LDL induces platelet aggregation through activation of phospholipase A2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:1131-1138.
300. Rother,E., R.Brandl, D.L.Baker, P.Goyal, H.Gebhard, G.Tigyi, and W.Siess. 2003. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 108:741-747.
301. Merten,M., J.F.Dong, J.A.Lopez, and P.Thiagarajan. 2001. Cholesterol sulfate: a new adhesive molecule for platelets. *Circulation* 103:2032-2034.
302. Blache,D., M.Becchi, and J.Davignon. 1995. Occurrence and biological effects of cholesteryl sulfate on blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 1259:291-296.
303. De Meyer,G.R., M.F.Hoylaerts, M.M.Kockx, H.Yamamoto, A.G.Herman, and H.Bult. 1999. Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:2524-2534.
304. Nichols,T.C., D.A.Bellinger, D.A.Tate, R.L.Reddick, M.S.Read, G.G.Koch, K.M.Brinkhous, and T.R.Griggs. 1990. von Willebrand factor and occlusive arterial thrombosis. A study in normal and von Willebrand's disease pigs with diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 10:449-461.
305. Burke,A.P., A.Farb, G.T.Malcom, Y.H.Liang, J.Smialek, and R.Virman. 1997. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N. Engl. J. Med.* 336:1276-1282.
306. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 308, 81-106. 1-8-1994.
Ref Type: Generic
307. Baigent C, Collins R, Appleby P, Parish S, Sleight P, and Peto R. ISIS2: 10 year survival among patients with suspected acute myocardial infarction in randomised comparison on

- intravenous streptokinase, oral aspirin, both or neither. *BMJ* 316, 1337-1343. 2-5-1998.
Ref Type: Generic
308. Bhatt,D.L., K.A.Fox, W.Hacke, P.B.Berger, H.R.Black, W.E.Boden, P.Cacoub, E.A.Cohen, M.A.Creager, J.D.Easton, M.D.Flather, S.M.Haffner, C.W.Hamm, G.J.Hankey, S.C.Johnston, K.H.Mak, J.L.Mas, G.Montalescot, T.A.Pearson, P.G.Steg, S.R.Steinhubl, M.A.Weber, D.M.Brennan, L.Fabry-Ribaudo, J.Booth, and E.J.Topol. 2006. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N. Engl. J. Med.* 354:1706-1717.
309. FitzGerald,G.A. 2004. Coxibs and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 351:1709-1711.
310. Falk,E. 1992. Why do plaques rupture? *Circulation* 86:III30-III42.
311. Burke,A.P., F.D.Kolodgie, A.Farb, D.K.Weber, G.T.Malcom, J.Smialek, and R.Virmani. 2001. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* 103:934-940.
312. Mann,J. and M.J.Davies. 1999. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. *Heart* 82:265-268.
313. Davies,M.J. 1992. Anatomic features in victims of sudden coronary death. Coronary artery pathology. *Circulation* 85:I19-I24.
314. van der Wal,A.C., A.E.Becker, C.M.van der Loos, and P.K.Das. 1994. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 89:36-44.
315. Farb,A., A.P.Burke, A.L.Tang, T.Y.Liang, P.Mannan, J.Smialek, and R.Virmani. 1996. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 93:1354-1363.
316. Beloqui,O., J.A.Paramo, J.Orbe, A.Benito, I.Colina, A.Monasterio, and J.Diez. 2005. Monocyte cyclooxygenase-2 overactivity: a new marker of subclinical atherosclerosis in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors? *Eur. Heart J.* 26:153-158.
317. Baker,C.S., R.J.Hall, T.J.Evans, A.Pomerance, J.Maclouf, C.Creminon, M.H.Yacoub, and J.M.Polak. 1999. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:646-655.

-
318. Stemme,V., J.Swedenborg, H.Claesson, and G.K.Hansson. 2000. Expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 20:146-152.
319. McGeer,P.L., E.G.McGeer, and K.Yasojima. 2002. Expression of COX-1 and COX-2 mRNAs in atherosclerotic plaques. *Exp. Gerontol.* 37:925-929.
320. Cipollone,F., M.Fazia, A.Iezzi, M.Zucchelli, B.Pini, C.D.De, S.Ucchino, F.Spigonardo, G.Bajocchi, R.Bei, R.Muraro, L.Artese, A.Piattelli, F.Chiarelli, F.Cuccurullo, and A.Mezzetti. 2003. Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans. *Circulation* 107:1479-1485.
321. Plump,A.S., J.D.Smith, T.Hayek, K.alto-Setala, A.Walsh, J.G.Verstuyft, E.M.Rubin, and J.L.Breslow. 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343-353.
322. Reddick,R.L., S.H.Zhang, and N.Maeda. 1994. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler. Thromb.* 14:141-147.
323. Mahley,R.W. 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240:622-630.
324. Zhang,S.H., R.L.Reddick, J.A.Piedrahita, and N.Maeda. 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258:468-471.
325. Nakashima,Y., A.S.Plump, E.W.Raines, J.L.Breslow, and R.Ross. 1994. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler. Thromb.* 14:133-140.
326. Staprans,I., X.M.Pan, J.H.Rapp, C.Grunfeld, and K.R.Feingold. 2000. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of atherosclerosis in LDL receptor- and apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:708-714.
327. Zhang,S.H., R.L.Reddick, B.Burkey, and N.Maeda. 1994. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J. Clin. Invest* 94:937-945.
328. Tangirala,R.K., E.M.Rubin, and W.Palinski. 1995. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences

- in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J. Lipid Res.* 36:2320-2328.
329. Williams,H., J.L.Johnson, K.G.Carson, and C.L.Jackson. 2002. Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:788-792.
330. Reddick,R.L., S.H.Zhang, and N.Maeda. 1998. Aortic atherosclerotic plaque injury in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 140:297-305.
331. Durand,E., A.Scoazec, A.Lafont, J.Boddaert, H.A.Al, F.Addad, M.Mirshahi, M.Desnos, A.Tedgui, and Z.Mallat. 2004. In vivo induction of endothelial apoptosis leads to vessel thrombosis and endothelial denudation: a clue to the understanding of the mechanisms of thrombotic plaque erosion. *Circulation* 109:2503-2506.
332. von der Thusen,J.H., B.J.van Vlijmen, R.C.Hoeben, M.M.Kockx, L.M.Havekes, T.J.van Berkel, and E.A.Biessen. 2002. Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E^{-/-} mice after adenovirus-mediated transfer of p53. *Circulation* 105:2064-2070.
333. Sasaki,T., M.Kuzuya, K.Nakamura, X.W.Cheng, T.Shibata, K.Sato, and A.Iguchi. 2006. A simple method of plaque rupture induction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26:1304-1309.
334. Trebino,C.E., J.D.Eskra, T.S.Wachtmann, J.R.Perez, T.J.Carty, and L.P.Audoly. 2005. Redirection of eicosanoid metabolism in mPGES-1-deficient macrophages. *J. Biol. Chem.* 280:16579-16585.
335. Gomez-Hernandez,A., J.L.Martin-Ventura, E.Sanchez-Galan, C.Vidal, M.Ortego, L.M.Blanco-Colio, L.Ortega, J.Tunon, and J.Egido. 2006. Overexpression of COX-2, Prostaglandin E synthase-1 and prostaglandin E receptors in blood mononuclear cells and plaque of patients with carotid atherosclerosis: regulation by nuclear factor-kappaB. *Atherosclerosis* 187:139-149.
336. Cipollone,F., M.Fazia, A.Iezzi, G.Ciabattoni, B.Pini, C.Cuccurullo, S.Ucchino, F.Spigonardo, L.M.De, C.Prontera, F.Chiarelli, F.Cuccurullo, and A.Mezzetti. 2004. Balance between PGD synthase and PGE synthase is a major determinant of atherosclerotic plaque instability in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1259-1265.
337. Ganz,P. and J.A.Vita. 2003. Testing endothelial vasomotor function: nitric oxide, a multipotent molecule. *Circulation* 108:2049-2053.

-
338. Lerman,A. and A.M.Zeiher. 2005. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 111:363-368.
339. Shio,H. and P.Ramwell. 1972. Effect of prostaglandin E 2 and aspirin on the secondary aggregation of human platelets. *Nat. New Biol.* 236:45-46.
340. MacIntyre,D.E. and J.L.Gordon. 1975. Calcium-dependent stimulation of platelet aggregation by PGE. *Nature* 258:337-339.
341. Pontsler,A.V., H.A.St, G.K.Marathe, G.A.Zimmerman, and T.M.McIntyre. 2002. Cyclooxygenase-2 is induced in monocytes by peroxisome proliferator activated receptor gamma and oxidized alkyl phospholipids from oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 277:13029-13036.
342. Tsukamoto,H., T.Hishinuma, R.Tayama, K.Narahara, N.Suzuki, Y.Tomioka, and J.Goto. 2004. The induction of prostaglandin E synthase and upregulation of cyclooxygenase-2 by 9-cis retinoic acid. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 74:61-74.
343. Gomez-Hernandez,A., E.Sanchez-Galan, J.L.Martin-Ventura, C.Vidal, L.M.Blanco-Colio, M.Ortego, M.Vega, J.Serrano, L.Ortega, G.Hernandez, J.Tunon, and J.Egido. 2006. Atorvastatin reduces the expression of prostaglandin E2 receptors in human carotid atherosclerotic plaques and monocytic cells: potential implications for plaque stabilization. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47:60-69.

Résumé

Les prostanoïdes sont des lipides dérivés de l'acide arachidonique (AA) jouant un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire. La prostaglandine E2 (PGE2), l'un d'eux facilite l'agrégation de plaquettes faiblement stimulées *in vitro*, en diminuant leur seuil d'activation. Ce mécanisme est dépendant de l'activation du récepteur EP3, un des quatre récepteurs de la PGE2. La PGE2 facilite la thrombose veineuse due à l'administration d'AA mais son rôle en physiopathologie doit être défini. Ce travail montre que la paroi artérielle soumise à des stress inflammatoires produit de la PGE2. Dans plusieurs modèles, nous avons montré que cette PGE2 produite par la paroi facilite la thrombose artérielle. Puis, nous avons montré que les plaques d'athérosclérose murines contiennent de grandes quantités de PGE2 et que cette PGE2 intra-plaque est fonctionnelle et capable d'activer son récepteur EP3. Nous avons aussi indirectement prouvé que la PGE2 peut franchir la plaque pour activer son récepteur EP3 présent sur les plaquettes sanguines. Finalement, l'athérombose provoquée *in vivo* par la rupture mécanique d'une plaque est significativement diminuée quand les plaquettes sont dépourvues de EP3. **En conclusion**, la PGE2 facilite l'initiation de la thrombose artérielle et aggrave l'athérombose. L'inhibition du récepteur EP3 plaquettaire devrait être utile dans le traitement de l'athérombose.

Abstract

Prostanoids, bioactive lipids derived from arachidonic acid (AA) are important for vascular homeostasis. Among them, prostaglandin E2 (PGE2) enhances aggregation of platelets sub-maximally stimulated *in vitro*. This results from activation of EP3, one of the four PGE2 receptors, which decreases the threshold at which agonists activate platelets to aggregate. Although PGE2 altered venous thrombosis induced by administration of AA, its role in physiopathological conditions has remained speculative. We report here that arterial wall subjected to inflammatory stimuli produces PGE2. In several models, we show that PGE2 by arterial wall facilitates arterial thrombosis. Next, we detected PGE2 in murine atherosclerotic plaques. We demonstrate that this plaque-produced PGE2 is not altered and is still able to activate EP3. In addition, we present evidences that PGE2 can leave the plaque and activate EP3 on blood platelets. Consistent with these findings, we observed that atherothrombosis induced *in vivo* by mechanical rupture of the plaque was drastically decreased when platelets lacked EP3. **In conclusion**, PGE2 facilitates the initiation of arterial thrombosis and hence contributes to atherothrombosis. Inhibition of its platelets EP3 receptor should improve prevention of atherothrombosis.