



HAL
open science

Intérêt d'un nouvel outil d'évaluation de la microcirculation et du glycocalyx endothélial en médecine interne : résultats préliminaires dans la sclérodermie systémique et le syndrome des antiphospholipides

Sébastien Miranda

► **To cite this version:**

Sébastien Miranda. Intérêt d'un nouvel outil d'évaluation de la microcirculation et du glycocalyx endothélial en médecine interne : résultats préliminaires dans la sclérodermie systémique et le syndrome des antiphospholipides. Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01116988

HAL Id: dumas-01116988

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01116988>

Submitted on 16 Feb 2015

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

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

**FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE
ROUEN**

Année 2014

**THESE POUR LE
DOCTORAT EN MEDECINE**

PAR

MIRANDA Sébastien

Né(e) le 09/07/1983 à LIMOGES

Présentée et soutenue publiquement le

24 Octobre 2014

**Intérêt d'un nouvel outil d'évaluation de la microcirculation
et du glycocalyx endothélial en médecine interne : Résultats
préliminaires dans la Sclérodermie systémique et le
Syndrome des antiphospholipides.**

Président du jury : M LEVESQUE Hervé, Professeur
Directeur de thèse : M BENHAMOU Ygal, Praticien hospitalier
Membres du jury : Mme TAMION Fabienne, Professeur
M VITTECOQ Olivier, Professeur
M RICHARD Vincent, Maître de conférences

**U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN
ANNEE UNIVERSITAIRE 2013 - 2014**

U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY

DOYENS HONORAIRES : **Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET - C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES : **M-P. AUGUSTIN – J. ANDRIEU-GUITRANCOURT – M. BENOZIO – J. BORDE – P. BRASSEUR – R. COLIN – E. COMOY – J. DALION – DESHAYES – C. FESSARD – J-P. FILLASTRE - P FRIGOT – J. GARNIER – J. HEMET – B. HILLEMAND – G. HUMBERT – J-M. JOUANY – R. LAUMONIER – P. LAURET – M. LE FUR – J-P. LEMERCIER – J-P. LEMOINE – H. MAGARD – B. MAITROT – M. MAISONNET – F. MATRAY – P. MITROFANOFF – A-M. ORECCHIONI – P. PASQUIS – H. PIGUET – M. SAMSON – D. SAMSON-DOLLFUS – J-C. SCHRUB – R. SOYER – B. TARDIF-J. TESTART – J-M. THOMINE – C. THUILLEZ – P. TRON – C. WINCKLER – L-M. WOLF**

I - MEDECINE

PROFESSEURS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno BACHY (<i>surnombre</i>)	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART (<i>surnombre</i>)	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Guy BONMARCHAND	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie

Mr Jean-François CAILLARD (<i>surnombre</i>)	HCN	Médecine et santé au travail
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HB	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN (<i>surnombre</i>)	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Jean DOUCET	HB	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel GODIN	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Philippe GRISE	HCN	Urologie
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato - Vénérologie
Mr Jean-Marc KUHN	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mr Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition

Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Francis MICHOT	HCN	Chirurgie digestive
Mr Bruno MIHOUT (<i>surnombre</i>)	HCN	Neurologie
Mr Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Jean-Marc PERON	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
Mr François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>mise en dispo</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme. Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mme Florence THIBAUT	HCN	Psychiatrie d'adultes
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie

Mr Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
Mr François TRON (surnombre)		Immunologie
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mr Jacques WEBER	HCN	Physiologie

**MAITRES DE
CONFERENCES**

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Bactériologie
Mr Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mr Francis ROUSSEL	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
M. Pierre-Hugues VIVIER	HCN	Imagerie Médicale

**PROFESSEUR AGREGE
OU CERTIFIE**

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais
Mme Cristina BADULESCU	UFR	Communication

II- PHARMACIE

PROFESSEURS :

M. Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
M. Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
M. Jean COSTENTIN (PU-PH)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
M. Jean Pierre GOULLE	Toxicologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme. Isabelle LEROUX	Physiologie
Mr Paul MULDER	Sciences du médicament
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS (Délégation CNRS)	Pharmacologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

MAÎTRES DE CONFÉRENCES :

Mle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
M. Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
M. Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
M. Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mle Cécile CORBIERE	Biochimie
M. Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mle Isabelle DUBUC	Pharmacologie
M. Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
M. François ESTOUR	Chimie organique
M. Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najila GHARBI	Chimie analytique
Mle Marie-Laure GROULT	Botanique
M. Hervé HUE	Biophysique et Mathématiques

Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
M. Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEUR ASSOCIÉ

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CONTRACTUEL

Mme Elizabeth DE PAOLIS	Anglais
Mr Thierry WABLE	Communication

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mr Jérémie MARTINET	Immunologie
----------------------------	-------------

ATTACHÉS TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Imane EL MEOUCHE	Microbiologie
Mme Juliette GAUTIER	Pharmacie galénique Mr Romy
RAZAKANDRAINIBE	Parasitologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mr Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie

Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III- MÉDECINE GÉNÉRALE

PROFESSEURS

M. Jean-Loup HERMIL	UFR	Médecine Générale
----------------------------	-----	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIÉS À MI-TEMPS :

M. Pierre FAINSILBER	UFR	Médecine Générale
-----------------------------	-----	-------------------

M. Alain MERCIER	UFR	Médecine générale
-------------------------	-----	-------------------

M. Philippe NGUYEN THANH	UFR	Médecine Générale
---------------------------------	-----	-------------------

MAÎTRES DE CONFÉRENCE ASSOCIÉS À MI-TEMPS :

M. Emmanuel LEFEBVRE	UFR	Médecine générale
-----------------------------	-----	-------------------

Mme Elisabeth MAUVIARD	UFR	Médecine générale
-------------------------------	-----	-------------------

Mme Marie-Thérèse THUEUX	UFR	Médecine générale
---------------------------------	-----	-------------------

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

M. Sahil ADRIOUCH	Biochimie et Biologie Moléculaire (Unité INSERM 905)
--------------------------	--

Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE	Biochimie et Biologie Moléculaire (Unité INSERM 1079)
--------------------------------------	---

Mme Carine CLEREN	Neurosciences (Néovasc)
--------------------------	-------------------------

Mme Pascaline GAILDRAT	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
-------------------------------	--

M. Antoine OUVRARD-PASCAUD	Physiologie (Unité INSERM 1076)
-----------------------------------	---------------------------------

Mme Isabelle TOURNIER	Biochimie (UMR 1079)
------------------------------	----------------------

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

M. Serguei FETISSOV	Physiologie (Groupe ADEN)
----------------------------	---------------------------

Mme Su RUAN	Génie Informatique
--------------------	--------------------

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique **DELAFONTAINE**

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

Remerciements

A Monsieur le Professeur Levesque :

Je vous remercie d'avoir accepté de présider cette thèse.

Merci d'avoir cru en ce travail (et dans les prochains) en faisant l'acquisition du Microscan.

Merci car vos connaissances, votre investissement pour les patients et pour cette discipline qu'est la médecine interne sont un modèle pour moi.

A Madame le Professeur Tamion

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Ce d'autant que c'est grâce à vous que j'ai entendu parler pour la première fois du glycocalyx endothélial et de l'intérêt qu'il représente.

Merci pour les séances de rappels sur les voies de signalisations intracellulaires à 3H du matin en garde de réanimation.

A Monsieur le Professeur Vittecoq

Je vous remercie d'accepter de juger cette thèse et d'apporter votre expertise à ce travail.

A Monsieur le Dr Richard

Je vous remercie d'accepter de juger cette thèse de médecine.

Merci d'avoir accepté de m'ouvrir les portes du laboratoire. L'année passée au sein de l'unité m'a permis de découvrir un monde passionnant et très complémentaire de notre activité clinique.

A Monsieur le Dr Benhamou

Merci pour ton investissement dans ce travail, d'avoir cru en ce projet et de l'avoir porté jusqu'à son aboutissement.

Merci de m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche (et le mulvany).

Merci bien sûr pour ton soutien et tes conseils précieux tout au long de ses années d'internat.

Enfin, merci d'être un moteur permanent pour le service, pour ton engagement et tes connaissances.

A mon épouse Claire

Merci pour ta présence, tu m'as soutenu pendant ces années d'internat qui n'ont pas toujours été faciles. Les derniers mois passé à Paris m'ont prouvé à quel point je tenais à toi.

Merci car ensemble nous avons pu construire une petite famille unie et heureuse.

A mes enfants Lucile et Alban

Vous êtes merveilleux.

A mes parents

Merci de votre soutien depuis toujours.

Merci d'avoir cru que je pourrais réussir en médecine (même si ça n'était pas gagné d'avance).

A Eric

Merci pour m'avoir accueilli chez toi ces derniers mois.

A mes amis Thomas, Greg, Damien, Audrey, Alexandre Romain et tous les autres

On se voit trop peu mais c'est chaque des moments formidables.

PLAN

Partie I : Le glycocalyx : un déterminant essentiel de la physiologie endothéliale		1
1	<u>Structure</u>	2
1.1	Protéoglycanes (PG) et glycosaminoglycanes (GAG)	2
1.2	Glycoprotéines	3
1.2.1	Glycoprotéines et adhésion cellulaire	3
1.2.2	Glycoprotéines impliquées dans la régulation de l'hémostase	3
1.3	Protéines solubles.	5
2	<u>Principales fonctions</u>	5
2.1	Perméabilité vasculaire	5
2.2	Adhésion, Rolling leucocytaire et modulation de l'inflammation.	6
2.3	Protection contre le stress oxydant	8
2.4	Perception du shear stress	8
2.5	Inhibition de la coagulation	8
3	<u>Facteurs de destructions du glycocalyx</u>	9
3.1	Stress oxydant	9
3.2	Shear stress	9
3.2.1	Conditions de flux laminaire	9
3.2.2	Conditions de flux dégradés	9
3.3	Rôle des métallo-protéases (MMP)	10
4	<u>Thérapeutiques ciblant le glycocalyx</u>	11
4.1	Administration de GAG : sulodexide	11
4.2	Administration d'anti thrombine	11
4.3	Lutte contre l'inflammation	13
4.4	Albumine	13
5	<u>Techniques d'évaluation</u>	13
5.1	<i>In vitro</i>	13
5.1.1	Microscopie électronique à transmission	13
5.1.2	Dosage des composés du glycocalyx	13
5.2	<i>In vivo</i> :	14
5.2.1	Microscopie intravitale	14
5.2.2	Estimation du volume total	14
Partie II : Une nouvelle technique d'exploration de la microcirculation : le microscan		16
1	<u>Principe physique :</u>	17
2	<u>Principales utilisations</u>	19
2.1	Etude de la microcirculation sublinguale	19
2.2	Estimation de l'épaisseur du glycocalyx	20
Partie III : Exemple 1 Utilisation du microscan en médecine interne		22
1	<u>Introduction</u>	23
1.1	SAPL : définition	23
1.2	SAPL et endothélium	23
1.3	Endothélium : structure et fonction	24
1.3.1	Structure, composition des vaisseaux	24
1.3.2	Dysfonction endothéliale	25
2	<u>Matériels et méthodes</u>	26
2.1	Population	26
2.2	Evaluation du glycocalyx	27

	2.2.1	Dosage des composés circulants	27
	2.2.2	Mesure de l'épaisseur du glycocalyx par Microscan®	27
	2.2.3	Choix du capillaire et du leucocyte d'intérêt	28
	2.2.4	Statistiques	28
3	Résultats		28
	3.1	Population	28
	3.2	Evaluation du glycocalyx par dosage des composés sériques	29
	3.2.1	Taux circulants de syndecan-1 et acide hyaluronique (figure10)	29
	3.2.2	Corrélation entre les marqueurs circulants et les paramètres endothéliaux	29
	3.2.3	Mesure de l'épaisseur du glycocalyx dans un sous-groupe de 5 patients et 5 témoins (tableau 5)	31
4	Discussion		32
Partie III : Exemple 2 Utilisation du microscan en médecine interne :			34
1	Introduction		34
	1.1	Présentation générale et épidémiologie	34
	1.2	Classifications	34
	1.3	Physiopathologie	35
	1.3.1	Atteintes micro vasculaires	35
	1.3.1.1	Altération de l'angiogénèse de la vasculogénèse	35
	1.3.1.2	Dysfonction endothéliale et peptides vasoactifs	36
	1.3.2	Une maladie auto-immune	36
	1.3.2.1	Immunité humorale	36
	1.4	Principales atteintes d'organe	38
	1.5	Explorations microcirculatoires dans la sclérodemie	39
	1.5.1	Capillaroscopie	39
	1.5.2	Explorations fonctionnelles	40
2	Matériels et méthodes		41
	2.1	Population	41
	2.2	Explorations microcirculatoires	41
	2.2.1	Microcirculation sublinguale	41
	2.2.2	Microcirculation digitale : capillaroscopie	42
3	Résultats		43
	3.1	Population	43
	3.2	Résultats des explorations microcirculatoires	45
	3.3	Sous-groupes de sclérodemie	45
	3.3.1	Comparaison formes actives versus tardives	45
	3.3.2	Comparaison des avec ou sans ulcère digitale	46
	3.4	Corrélations entre le score capillaroscopique et la microcirculation sublinguale (figure 15).	47
	3.5	Corrélation intra observateur.	47
	3.6	Mesure de l'épaisseur du glycocalyx par microscan (figure 16).	48
4	Discussion		49
CONCLUSIONS :			53
REFERENCES :			54

Liste des abréviations :

aPL	Anticorps antiphospholipides
APL	Antiphospholipides
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
GAG	Glycosaminoglycane
MFI	Microvascular flow index
PVD	Perfused vessels density
OPS	Orthogonalized polarization spectral
PG	Protéoglycanes
SAPL	Syndrome des antiphospholipides
ScS	Sclérodémie systémique
SDF	Sidestream dark field
TVD	Total vascular density

Liste des figures :

Figure 1: Organisation schématique du glycocalyx endothéliale (6).....	3
Figure 2 :Rôle du glycocalyx dans la régulation de l'adhésion leucocytaire(19).....	7
Figure 3 : Inhibition des métalloprotéases via l'interaction S1P-S1P1(35)	10
Figure 4 : Glycocalyx en microscopie électronique sur des coronaire de hamster	12
Figure 5 : Visualisation du gap par microscopie électronique(47)	15
Figure 6: Microscopie intra vitale	15
Figure 7: Microscan®	18
Figure 8: Principe physique du microscan .(52)	18
Figure 9 : Visualisation de la microcirculation sublinguale à l'aide d'un Microscan®.....	21
Figure 10 : Taux sériques de syndecan-1 et d'acide hyaluronique chez les patients atteints de SAPL et les témoins.....	30
Figure 11 : Corrélations entre les paramètres vasculaires et les composants du glycocalyx	31
Figure 12 :Type d'atteinte cutanée selon le profil des auto-anticorps (103).....	37
Figure 13 : Exemples de capillaroscopie :	40
Figure 14 : Thermographie au cours d'une phase syncopale de phénomène de Raynaud	41
Figure 15 : Laser Doppler : (a) en haut un flux capillaire normal, en bas absence de flux capillaire détectable	41
Figure 16 : Corrélations entre le score capillaroscopique et la microcirculation sublinguale	47
Figure 17 : Epaisseur du glycocalyx au niveau des capillaires sublinguaux évalué par microscan ..	48

Liste des tableaux :

Tableau 1 Caractéristiques des protéoglycanes (6)	3
Tableau 2: Composition des glycosaminoglycanes (6).....	3
Tableau 3: Caractéristiques de la population	29
Tableau 4: Epaisseur du glycocalyx chez 5 patients atteints de SAPL.....	31
Tableau 5: Principales atteintes d'organes de la sclérodémie systémique	38
Tableau 6: Description du principe d'évaluation semi quantitative de paramètres morphologiques en capillaroscopie.	43
Tableau 7: Caractéristiques de la population étudiée.....	44
Tableau 8: Résultats de l'analyse capillaroscopique et de la microcirculation sublinguale	45
Tableau 9 : Caractéristiques des patients sclérodermiques selon leur profil capillaroscopique	46
Tableau 10 : Caractéristiques des patients sclérodermiques en fonction de l'antécédent ulcère digital	46
Tableau 11: Corrélation inter classe	47

PARTIE I :

**Le glycocalyx, déterminant essentiel de la physiologie
endothéliale.**

1 Structure

Le glycocalyx est une couche d'hydrates de carbone située à la face la plus interne des cellules endothéliales de l'ensemble du réseau vasculaire. Il est arrimé à la surface de l'endothélium par l'intermédiaire de protéoglycanes (PG) et de glycoprotéines. Ces différents composés sont maintenus entre eux par un assemblage complexe de glycosaminoglycanes (GAG). L'épaisseur du glycocalyx est estimée à 0,5 μm pour les capillaires musculaires¹⁴⁴ 2-3 μm pour les petites artères⁵⁸ et à 4,5 μm pour les carotides⁹⁸. Sa structure varie d'un site anatomique à l'autre reflétant l'adaptation des artères à leurs fonctions de conductance ou de résistance. Il existe également une variation de structure entre la partie la plus luminale du glycocalyx riche en protéines solubles plasmatiques et la partie la plus interne abritant des protéines membranaires.

1.1 Protéoglycanes (PG) et glycosaminoglycanes (GAG)

Les PG représentent les constituants essentiels du glycocalyx, ils sont formés d'une protéine core et d'une association de glycosaminoglycanes. Il en existe plusieurs types qui sont répertoriés dans le tableau 1. La famille des syndécans est particulièrement représentée avec 4 sous-classes différentes dont la particularité réside dans leur ancrage transmembranaire avec une partie intracytoplasmique capable de transmettre un signal. Le syndecan-1 est une protéine formée de 8 domaines lui permettant de fixer des GAG comme les chaînes d'heparan sulfate (HS) et de chondroïtine sulfate (CS) sur son versant extracellulaire mais également le cytosquelette *via* un domaine intra-cytosolique de liaison à l'actine. Ainsi cette molécule constitue l'un des ponts entre le glycocalyx et le cytosquelette.

Les GAG sont quant à eux des polymères linéaires de disaccharides qui possèdent des zones hypo ou au contraire hyper sulfatées qui constituent des domaines de liaison avec des protéines circulantes.

A ce jour, 5 GAG sont caractérisés (tableau 2), parmi lesquels l'heparan sulfate, le chondroïtine sulfate et l'acide hyaluronique sont les plus représentés. L'acide hyaluronique est un long polymère pauvre en sulfate pouvant atteindre 1000 kDa. Sa synthèse est assurée par trois types de hyaluronan synthase qui sécrètent des chaînes d'acide hyaluronique de longueurs différentes.^{30,79,120,122,146}. Une fois synthétisé, l'acide hyaluronique se fixe à la membrane cellulaire endothéliale *via* le CD44, une protéine transmembranaire reliée au cytosquelette.

Core protein group	Core protein size (kDa)	Number of subtypes	Number of GAG-chains linked	Type of GAG-chains linked	Structural relation to cell membrane
Syndecan	19–35	4	5	HS/CS	Membrane-spanning
Glypican	57–69	6	3	HS/CS	GPI-anchor
Perlecan	400	1	3	HS/CS	Secreted
Versican	370	1	10–30	CS/DS	Secreted
Decorin	40	1	1	CS/DS	Secreted
Biglycan	40	1	2	CS/DS	Secreted
Mimecan	35	1	2–3	KS	Secreted

GAG Glycosaminoglycan, HS heparan sulfate, CS chondroitin sulfate, DS dermatan sulfate, KS keratan sulfate, GPI glycosylphosphatidylinositol

Tableau 1 Caractéristiques des protéoglycanes ¹²²

Table 2 Composition of the disaccharides of various glycosaminoglycan chains

	Heparan sulfate	Chondroitin sulfate	Dermatan sulfate ^a	Hyaluronan	Keratan sulfate
Uronic acid	GlcA(2S) IdoA(2S)	GlcA	GlcA IdoA(2S)	GlcA	Gal(6S)
Disaccharide link	1β4	1β3	1β3	1β3	1β4
Hexosamine	GlcNAc(NS)(3S)(6S)	GalNAc4S ^a GalNAc6S ^a	GalNAc(4S)(6S)	GlcNAc	GlcNAc(6S)
Polymerization link	1β4	1β4	1β4	1β4	1β3

Tableau 2: Composition des glycosaminoglycanes ¹²²

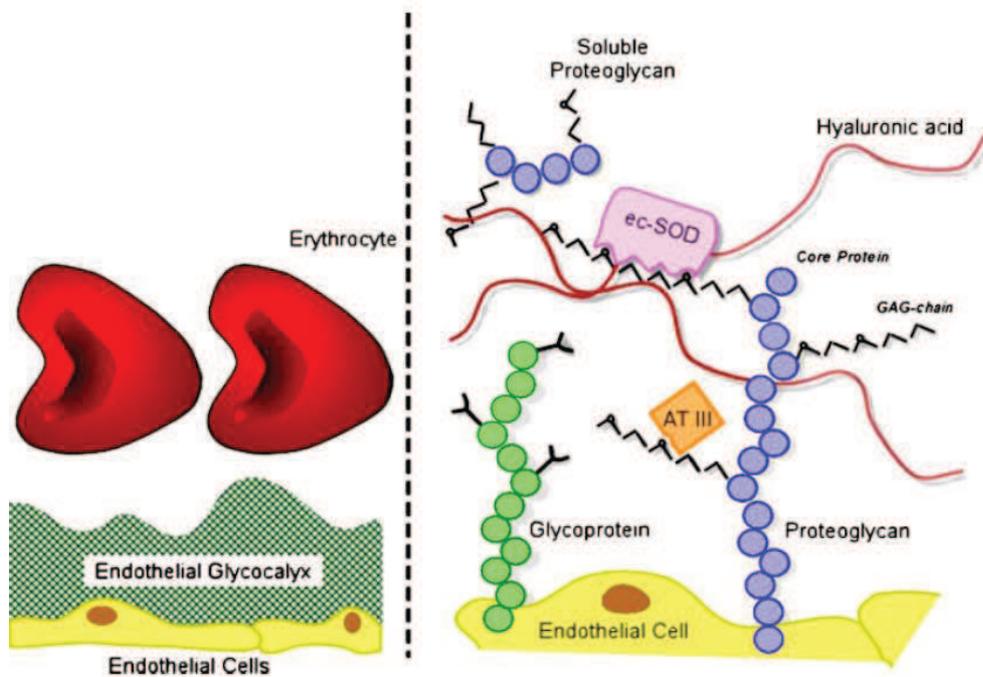


Figure 1: Organisation schématique du glycocalyx endothéliale ¹²²

1.2 Glycoprotéines

1.2.1 Glycoprotéines et adhésion cellulaire

Les principales glycoprotéines impliquées dans l'adhésion cellulaire sont les sélectines, les intégrines et la grande famille des immunoglobulines.

- Les sélectines

Les sélectines sont constituées d'un domaine cytoplasmique court, d'un domaine transmembranaire et d'un long domaine extracellulaire. Celui-ci contient des motifs structuraux répétitifs C (constant), un domaine de type EGF et un domaine de type lectine. Il existe 3 grands types de sélectines, les P-sélectine, E-sélectine, et L-sélectine. Les P-sélectines sont synthétisées par les cellules endothéliales puis stockées dans des vésicules intra-cytoplasmiques ou corps de Weibel-Palade. Leur ligand PSGL-1 se trouve sur l'ensemble des leucocytes. Elles jouent donc un rôle essentiel dans le rolling des leucocytes qui est le pré-requis indispensable à la migration de ceux-ci. Les sélectines peuvent être mobilisées très rapidement en réponse au TNF α , au lipopolysaccharide, à la thrombine, à la fraction C5a du complément et aux ionophores calciques.

- Les intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères formés de deux sous unités, alpha et bêta liées de manière non covalente. Chaque chaîne est formée d'un domaine intra-cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine extracellulaire. Il existe 18 chaînes alpha différentes, 8 chaînes bêta et 20 hétérodimères sont décrits à ce jour. Les intégrines ont un rôle essentiel dans l'agrégation plaquettaire, l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire et dans l'adhésion leucocytaire à la cellule endothéliale *via* l'hétérodimère $\alpha V\beta 3$.

- La grande famille des immunoglobulines

Ces immunoglobulines sont composées d'un domaine intra-cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire et d'un nombre variable de types d'immunoglobulines développés en extracellulaire. Les plus connues sont les *intercellular adhesion molecule 1 and 2* (ICAM-1 and -2), les *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), et le *platelet/ endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1). Leur fonction est essentielle dans l'étape finale du homing : la diapédèse leucocytaire. Elles sont le ligand des intégrines situées sur les leucocytes et les plaquettes. ICAM-1,2 et PECAM-1 ont une expression constitutive, alors que VCAM-1 a une expression inductible notamment sous l'effet des cytokines pro inflammatoires.

1.2.2 Glycoprotéines impliquées dans la régulation de l'hémostase.

D'autres glycoprotéines du glycocalyx participent à la régulation de l'hémostase. La principale est le complexe Gp1b qui est composé de 8 sous-unités et qui permet la liaison de la cellule endothéliale au facteur von willebrand¹³⁶ et participe ainsi à l'agrégation plaquettaire ainsi qu'à

l'étape initiale de l'activation plaquettaire.

1.3 Protéines solubles.

De nombreuses protéines circulantes interagissent avec le glycocalyx permettant de stabiliser la structure du glycocalyx par l'intermédiaire des interactions protéoglycanes membranaires-protéines solubles-GAG. Plusieurs fonctions sont également régulées par ces interactions entre des médiateurs solubles et les GAG comme par exemple :

- l'angiogenèse, puisque des facteurs pro angiogéniques tels que le FGF peuvent se lier au perlecan qui agit comme un récepteur de faible affinité permettant ensuite au FGF de se fixer à son récepteur membranaire de haute affinité ⁶⁵⁵⁰.
- l'inflammation avec notamment les chimiokines responsables de l'attraction des leucocytes ⁶⁸.
- l'hémostase puisque les GAG sont le support des sérines protéases et des serpinines ²¹.

2 Principales fonctions

Le glycocalyx du fait de sa position au contact de la circulation sanguine est une structure dynamique s'adaptant aux différentes contraintes physico-chimiques. Ses principales fonctions sont celles classiquement décrites pour l'endothélium vasculaire.

2.1 Perméabilité vasculaire

Plusieurs équipes ont mis en évidence dans des modèles d'œdème myocardique induits par injection de hyaluronidase que l'altération du glycocalyx était à l'origine d'un œdème tissulaire. Le glycocalyx joue un rôle fondamental dans la régulation de la perméabilité vasculaire par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, il semble que le glycocalyx délimite un espace pauvre en protéines grâce à son rôle de filtre. Ainsi en excluant les protéines, le glycocalyx génère une différence de pression oncotique qui retiendrait l'eau dans le secteur intraluminaire. ¹. De plus il existe une régulation directe du glycocalyx sur le maintien de la cohésion entre les cellules endothéliales *via* une action sur les jonctions serrées. A l'état basal, les cellules endothéliales ont une conformation qui est maintenue par les filaments d'actine situés sous la membrane. Cet état est sous la dépendance de protéines telles que la filamine, l'annexine II, les protéines S100, et la voie AKT/Tiam1/RAC1 ¹³⁰¹²⁹. Les filaments de haut poids moléculaire d'acide hyaluronique augmentent l'expression de ces protéines stabilisatrices du cytosquelette lorsqu'elles se lient au CD44. Egalement, les molécules d'acide hyaluronique de haut poids moléculaire peuvent se lier à la sérine protéase HBPA2 (Hyaluronic Acid binding protein 2) et inhiber son action déstabilisatrice du cytosquelette ⁸⁸. De ce fait, lorsque le

glycocalyx est altéré et plus particulièrement l'acide hyaluronique sous l'effet d'un stress oxydant, une augmentation de la production de RhoA –GTP apparait. Celle-ci est responsable de l'activation de la Rho kinase (ROCK) puis de la formation de fibres d'actine de stress et ainsi de la rupture de la barrière endothéliale qui s'accompagne d'une majoration de la perméabilité membranaire.¹²⁸

2.2 Adhésion, Rolling leucocytaire et modulation de l'inflammation

Parmi les étapes de l'inflammation conduisant les leucocytes à exercer leur action dans les tissus, l'étape cruciale du passage du secteur vasculaire vers le secteur tissulaire est régulée par l'endothélium. Ce phénomène est divisé en trois phases :

1. le rolling qui correspond au phénomène de ralentissement des leucocytes sur l'endothélium. Ce phénomène est sous la dépendance des sélectines.
2. l'adhésion forte qui est sous la dépendance des intégrines.
3. la diapédèse qui implique la grande famille des immunoglobulines.

La régulation de l'adhésion leucocytaire dépend de l'affinité des ligands à leurs récepteurs⁸². De plus, il est intéressant de noter que le glycocalyx joue probablement un rôle important dans la régulation de cette adhésion. En effet, les GAG qui constituent le glycocalyx atteignent une épaisseur variable comprise généralement entre 0,4 à 0,5 μm au niveau des veinules post capillaires¹⁴⁴. La longueur des glycoprotéines responsables de l'adhésion leucocytaires atteignent 0,02 μm pour les intégrines et 0,03-0,04 μm pour les sélectines¹³¹. Il est donc facile d'imaginer que les GAG forment un véritable tapis protecteur limitant l'interaction entre ces molécules d'adhésions et leurs ligands situés à la surface des leucocytes. Ces données ont été confirmées par plusieurs études qui ont démontré que dans certaines situations cliniques (ischémie-reperfusion, choc septique) associées à la dégradation du glycocalyx l'adhésion leucocytaire étaient accrues (figure 2)

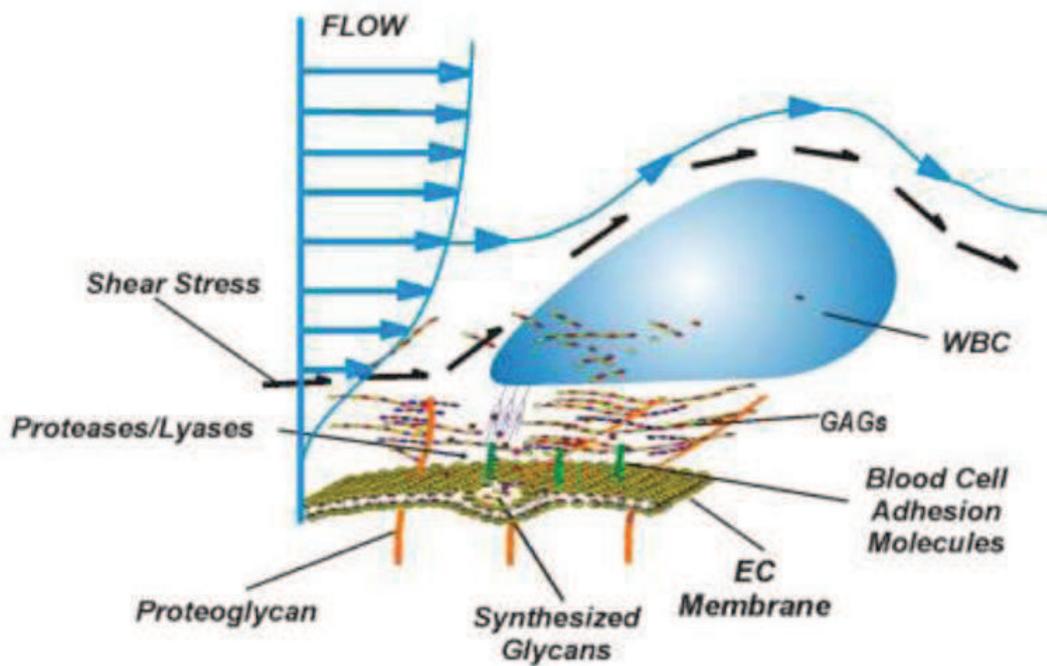


Figure 2 :Rôle du glycocalyx dans la régulation de l'adhésion leucocytaire⁸²

2.3 Protection contre le stress oxydant

Parmi les nombreuses protéines solubles exerçant leurs fonctions *via* le glycocalyx, l'une d'entre elles a un rôle privilégié dans la protection contre le stress oxydant. Il s'agit de la SOD et notamment de son isoforme soluble EC-SOD (endothelial cell superoxyde dismutase). Cette protéine se trouve à plus de 90% dans les tissus à des concentrations 20 fois supérieures au niveau des surfaces cellulaires par rapport au plasma grâce à son affinité particulière pour l'héparan sulfate.⁴⁶ La SOD permet la dismutation de deux anions superoxyde en O₂ et H₂O₂.

2.4 Perception du shear stress

L'une des propriétés des artères et de pouvoir adapter leur diamètre en fonction du flux sanguin par la perception de la contrainte de cisaillement pariétale ou shear stress. Ce shear stress induit l'activation de la voie PI3 kinase/AKT dans la cellule endothéliale. Puis la eNOS est phosphorylée ce qui conduit à sa dimérisation sous forme active lui permettant de produire du monoxyde d'azote à partir de L-arginine. Le NO va diffuser localement dans les cellules musculaires lisses et va provoquer une activation de la GMPc à l'origine d'une relaxation des fibres musculaires et donc une augmentation du diamètre du vaisseau. Il est maintenant bien établi que le mécano récepteur à l'origine de la perception de ce shear stress est le glycocalyx lui-même. Plusieurs équipes ont montré que l'acide hyaluronique et l'héparan sulfate étaient les principaux GAG impliqués dans ce rôle de mécano récepteur. En effet, la digestion enzymatique de certains GAG tels que l'acide hyaluronique ou l'héparan sulfate aboutit à la disparition de la production de NO en réponse au shear stress. En revanche la dégradation du chondroïtine sulfate n'altère pas la vasoréactivité médiée par le flux.¹³⁷

2.5 Inhibition de la coagulation

Outre ses propriétés vasoactives, l'endothélium exerce un contrôle permanent de la coagulation en maintenant notamment les phospholipides chargés positivement au contact du sang circulant et en masquant les substances pro-coagulantes. Le glycocalyx joue un rôle important dans cette inhibition. En effet, plusieurs protéines susceptibles de limiter la coagulation sont portées par le glycocalyx²¹ :

- L'anti-thrombine dont le cofacteur physiologique est l'héparan sulfate inactive la thrombine, ainsi que les facteurs X et IX activés
- La thrombomoduline qui se lie à la chondroïtine sulfate permet de lier la thrombine et de la rendre accessible à la protéine C.
- Le cofacteur II de l'héparine a également un rôle d'inactivation de la thrombine.
- Le TFPI qui est porté par l'héparan sulfate a pour rôle l'inactivation des facteurs VII et X activés.

Ainsi il a été montré dans une étude menée chez des volontaires sains que la destruction du glycocalyx médiée par une hyperglycémie était associée à une activation de la coagulation augmentant le risque thrombotique.¹⁰⁹

3 Facteurs de destruction (shedding) du glycocalyx

3.1 Stress oxydant

Le glycocalyx a été retrouvé altéré dans de nombreuses situations associées à un stress oxydant accrue tel que le diabète¹¹³, l'hémodialyse¹¹⁵, l'ischémie-reperfusion⁵⁴. Un effet direct des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sur la dégradation des GAG a pu être mis en évidence dans une étude effectuée sur des cellules en culture¹⁰⁵. De même l'effet néfaste de ces espèces radicalaires est suggéré par le rôle protecteur d'agents captant les ROS comme la superoxyde dysmutase (SOD)⁷⁴

3.2 Shear stress

3.2.1 Conditions de flux laminaire :

L'équipe de Caro et *al.* a montré que les dépôts d'athérome étaient plus fréquents dans les zones ayant un faible « shear stress ». Les auteurs suggèrent que cet effet protecteur est médié par le glycocalyx puisque celui-ci a pour rôle de percevoir ce « shear stress » et de stimuler la production de NO dont le rôle anti athéromotique est connu²⁵. De plus, Wang et *al.* ont mis en évidence sur des artères de rats que l'épaisseur du glycocalyx était plus importante dans les zones exposées à un flux important⁵⁵. De même l'équipe d'Arisaka a montré que l'exposition de cellules endothéliales aortiques de porc à un flux laminaire entraînait une production accrue de GAG et de protéoglycanes⁶.

3.2.2 Condition de flux dégradés

En condition de flux dégradé, l'épaisseur du glycocalyx diminue dans les parois artérielles. Les artères exposées à ces conditions circulatoires développent préférentiellement des lésions d'athérome¹⁹. Ainsi, il semblerait que le stress pariétal entraîne, en association à des agressions pro-athérogènes (hyperglycémie, inflammation chronique), une destruction du glycocalyx et de ce fait, le développement de lésions athéromateuses⁵⁵.

3.3 Rôle des métallo-protéases (MMP)

Les principales protéines responsables de la digestion enzymatique des GAG appartiendraient à la famille des MMP. Il s'agit d'une grande famille de protéases formées autour d'atomes de zinc qui jouent un rôle dans le remodelage du tissu normal au cours de la croissance des os, la cicatrisation, la reproduction, mais aussi le développement des cancers, de l'inflammation et des maladies cardiovasculaires. Les MMP peuvent être stockées à l'intérieur de vésicules dans l'endothélium sous forme de précurseurs inactifs et sécrétées rapidement sous l'action d'un stimulus. Il a été montré que MMP -7, avait une forte affinité pour l'héparan sulfate et que les MMP -2, MMP- 7, MMP-9 étaient capables de cliver directement le chondroïtine sulfate⁵⁶. En outre, MMP- 1 peut également cliver l'héparan-sulfate et le syndécan-1⁴². Actuellement, un intérêt particulier est porté sur la sphingosine-1-phosphate (S1P). En effet, cette protéine peut se lier à un récepteur membranaire le S1PR qui protégerait le glycocalyx *via* l'inhibition des MMP.¹⁵⁰ (figure 3). Enfin, une étude récente a également montré un effet protecteur de la doxycycline sur le glycocalyx *via* l'inhibition des MMP⁸³

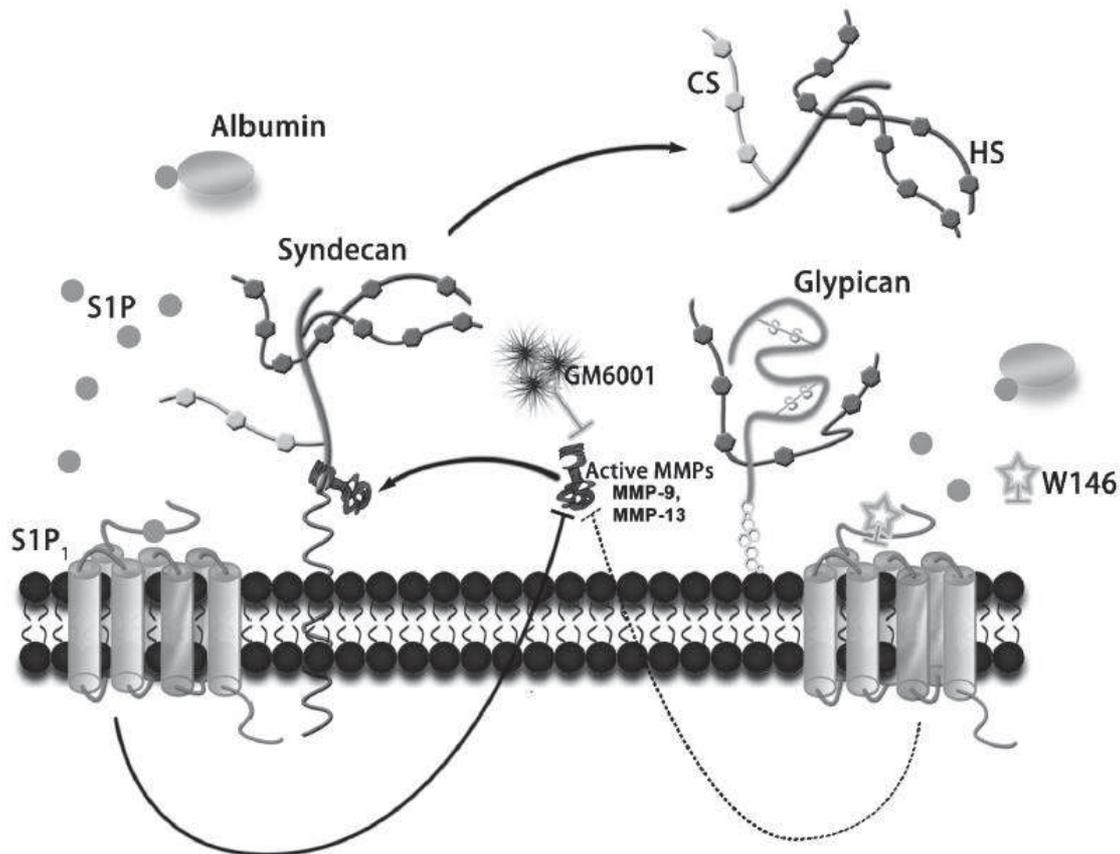


Figure 3 : Inhibition des métalloprotéases *via* l'interaction S1P-S1P1¹⁵⁰

4 Thérapeutiques ciblant le glycoalyx

4.1 Administration de GAG : exemple du sulodexide

Le sulodexide est une molécule formée de 2 GAG, le dermatan sulfate 20% et l'heparan sulfate 80% issus de la muqueuse de porc. Ce traitement peut être administré par voie veineuse ou par voie orale où il a l'avantage contrairement aux héparines d'être absorbée sans être détruit. Le sulodexide exerce principalement un effet anticoagulant *via* l'inhibition des facteurs X et II. Son mécanisme d'action repose sur l'activation de l'antithrombine *via* l'heparan sulfate et du cofacteur II de l'heparine *via* le dermatan sulfate. Les tests de coagulation sont donc modifiés avec un allongement du temps de thrombine et du temps de prothrombine. Le sulodexide exerce également une action sur la voie extrinsèque de la coagulation en inhibant l'expression du facteur tissulaire *in vitro* et *in vivo*². Outre son effet sur la coagulation, le sulodexide a un effet bénéfique direct sur le glycoalyx endothélial²² probablement par l'intermédiaire d'un effet anti inflammatoire et d'une inhibition des MMP 9⁹². Ainsi des essais cliniques rapportent un intérêt possible de cette molécule dans des pathologies vasculaires chroniques où l'altération du glycoalyx joue un rôle crucial comme dans la maladie athéromateuse (artériopathie des membres inférieurs)³³, ou dans l'évolution de la protéinurie dans la néphropathie diabétique⁴⁹.

4.2 Administration d'anti thrombine

L'anti thrombine pourrait avoir un intérêt dans la protection du glycoalyx *via* sa liaison à l'heparan sulfate en augmentant la production de prostacycline qui a un effet inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et anti inflammatoire. De plus, l'anti thrombine est capable de cliver la thrombine, la plasmine, la protéase 3 et l'élastase protégeant ainsi les protéines du glycoalyx de l'action protéolytique de ces enzymes. L'ensemble de ces effets a été mis en évidence dans des modèles animaux d'ischémie-reperfusion cardiaque (figure 4) et d'inflammation induit par l'administration de TNF-alpha.^{30),(45)}.

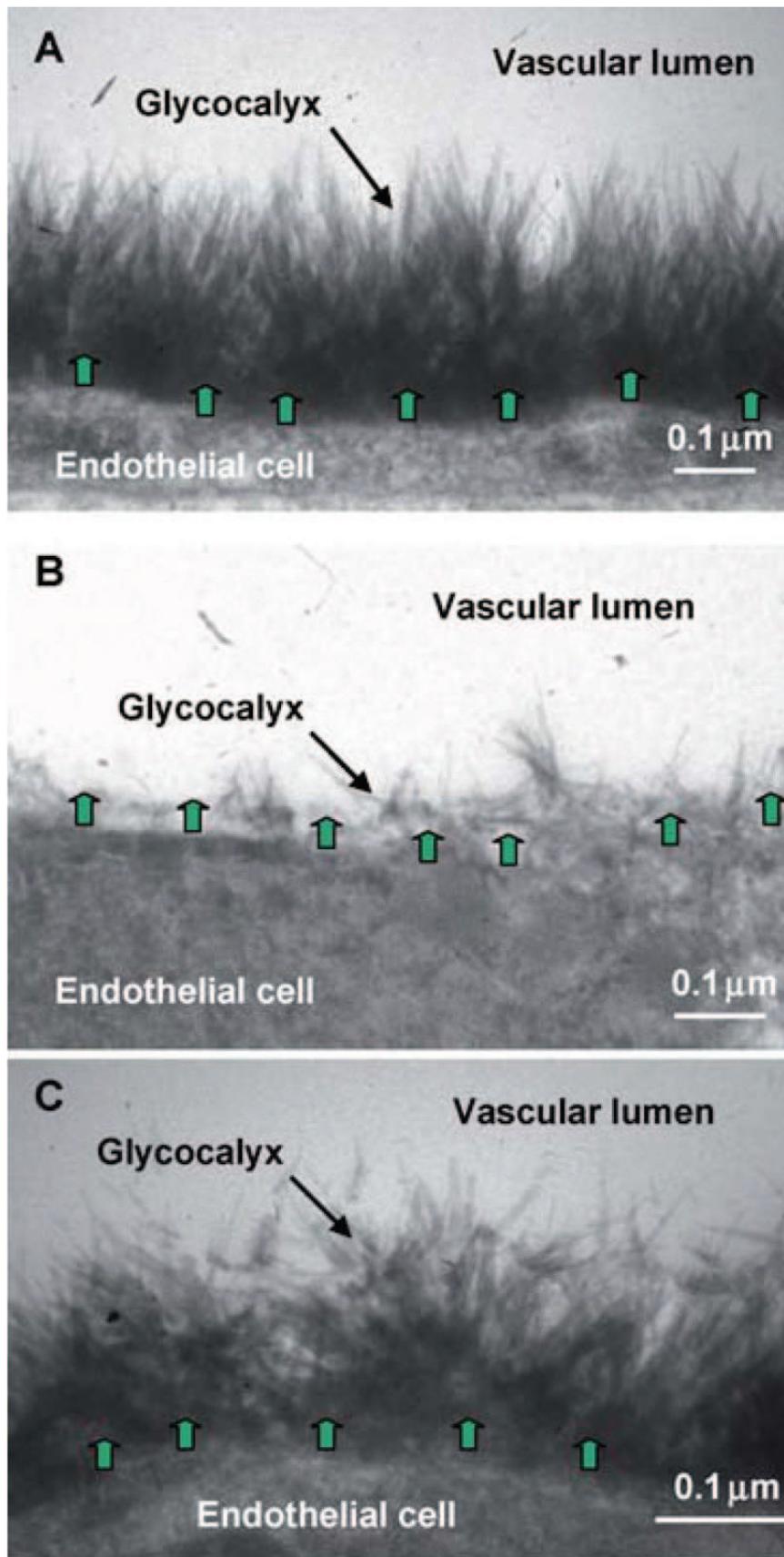


Figure 4 : Glycocalyx en microscopie électronique sur des coronaires de hamster
A. Condition normale ; B. Après ischémie reperfusion (I/R), C. I/R et pré-traitement par de l'antithrombine³⁰

4.3 Lutte contre l'inflammation :

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'activation endothéliale en induisant entre autre la destruction du glycocalyx. L'administration d'un traitement anti-TNF α comme l'Etanercept (récepteur soluble du TNF α) a prouvé après injection de LPS chez des sujets sains, un effet protecteur endothélial comparativement à un placebo ¹¹².

Egalement, les corticostéroïdes, ont montré un effet protecteur sur le glycocalyx ¹³ notamment dans un modèle d'ischémie reperfusion cardiaque ³¹. Cet effet serait médié par une inhibition des mastocytes qui relarguent classiquement de nombreuses substances agressives pour l'endothélium telles que les héparanases et l'histamine.

4.4 Albumine.

Les phénomènes d'hyperperméabilité capillaire dans des situations de réanimation ont conduit les praticiens à utiliser différents solutés de remplissages dont l'albumine. Bien que n'ayant pas fait ses preuves dans des études cliniques, il semblerait que l'albumine ait un effet protecteur sur la fonction endothéliale et sur le glycocalyx ⁶⁶.

5 Techniques d'évaluation du glycocalyx

5.1 In vitro

5.1.1 Microscopie électronique à transmission :

La première visualisation du glycocalyx date de 1966 grâce à l'utilisation d'un microscope électronique à transmission. La limite principale était la fragilité du glycocalyx qui supportait mal la préparation. Ainsi, il était estimé à 20 nanomètres dans les capillaires à l'aide d'une sonde au ruthénium rouge. Plus récemment van den Berg et *al.* l'ont mesuré entre 200 et 500 nanomètres dans des capillaires cardiaques à l'aide d'une coloration au bleu Alcian 8GX¹⁹.

5.1.2 Dosage sérique des composés du glycocalyx.

Il est possible de doser différents composés du glycocalyx dans le plasma des sujets comme le syndecan-1, l'acide hyaluronique ou l'heparan sulfate. L'élévation des taux sériques des constituants principaux du glycocalyx est un reflet indirect de sa dégradation. De façon similaire, le dosage des enzymes responsables de sa dégradation, comme la hyaluronidase ou l'héparanase permet de renseigner de l'état du glycocalyx. Ainsi Nieuwdorp a montré qu'une épreuve d'hyperglycémie était à l'origine d'une diminution du volume du glycocalyx mais également d'une élévation de la hyaluronidase et de l'acide hyaluronique ¹¹³ La plupart de ces dosages sont disponibles dans des trousse commerciales sous forme de test ELISA.

5.2 In vivo

5.2.1 Microscopie intravitale :

La visualisation de la paroi vasculaire d'un organe comme le mésentère ou le muscle crémaster peut se faire par trans-illumination à l'aide d'un microscope qui permet de mettre en évidence la paroi vasculaire mais aussi le contenu qui apparaît en noir. Ainsi Vink et *al.* ont montré qu'il existait un espace entre la paroi et la zone circulante des vaisseaux. Cet espace ou *gap* correspond au glycocalyx. (figure 5)¹⁴². De même, il est possible d'opacifier la partie luminale du vaisseau par l'injection d'un fluorochrome couplé à une molécule de haut poids moléculaire qui ne diffuse donc pas au travers du glycocalyx et ainsi de suivre son évolution au cours du temps.

Enfin, dans les capillaires de moins de 10 µm, la rigidité élevée de la paroi des globules blancs permet d'aplatir le glycocalyx.¹⁴⁴ Il est donc possible d'estimer l'épaisseur du glycocalyx en mesurant la différence d'épaisseur de la lumière vasculaire avant et après le passage d'un leucocyte et de diviser cette valeur par 2.

5.2.2 Estimation du volume total.

L'estimation du volume total du glycocalyx peut être faite en déduisant le volume plasmatique au volume intravasculaire total. Le volume plasmatique est lui-même calculé par la formule suivante : volume circulant plasmatique = [(1-Hématocrite) x Volume érythrocytaire total]/Hématocrite. Le volume érythrocytaire total correspond à la masse sanguine qui se mesure après marquage des érythrocytes autologues par de la fluorescéine et qui sont réinjectés au patient. Les dosages successifs des érythrocytes marqués en cytométrie de flux permettent d'estimer le volume total des érythrocytes. Le volume intravasculaire total comprenant la zone circulante et le glycocalyx est mesuré par l'injection de dextran 40kDa marqué au FITC qui est une molécule de petite taille diffusible dans le glycocalyx. Les dosages successifs permettent d'évaluer le volume de diffusion de cette molécule. (1,51,52)¹⁴⁴.

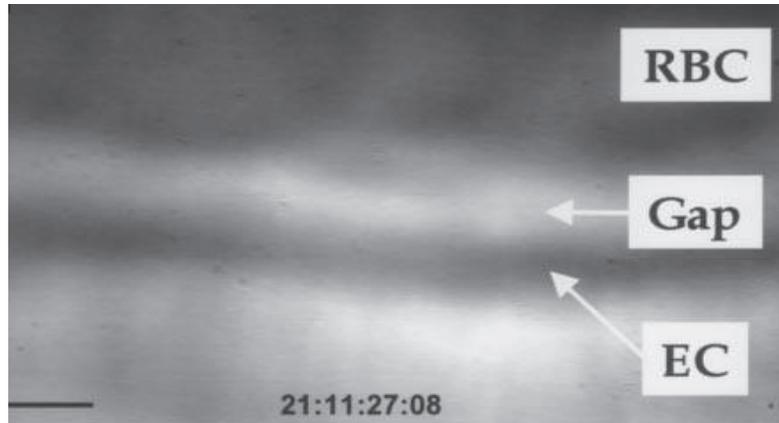


Figure 5 : Visualisation du gap par microscopie électronique¹⁴²

RBC : red blood cell, EC endothelial cell

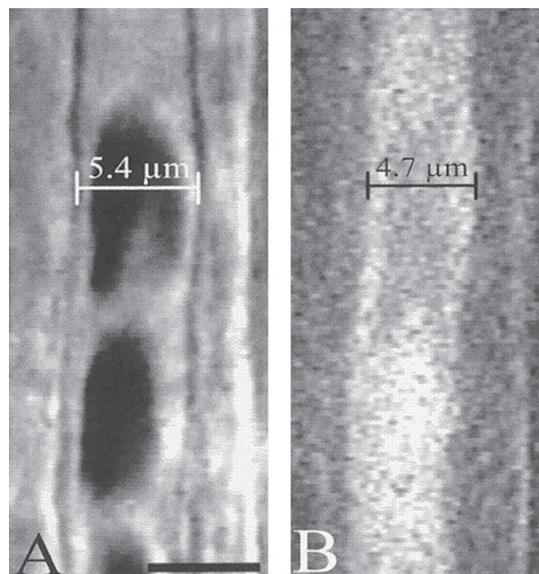


Figure 6: Microscopie intra vitale

A: Mesure du diamètre du vaisseau en l'absence de fluorochrome ; **B.** visualisation de la lumière du vaisseau après injection de FITC-dextran de haut poids moléculaire ¹⁴⁴

Partie II

**Nouvelle technique d'exploration de la
microcirculation : le Microscan®.**

1 Principe physique:

La technique *Sidestream dark field* (SDF) permet de visualiser le flux microcirculatoire à la surface des muqueuses au moyen d'une caméra équipée de diodes émettant une lumière verte stroboscopique (Microscan®, MicroVisionMedical, Amsterdam, Pays Bas) (Figure 7). Il s'agit d'une évolution de la technologie d'imagerie par Spectroscopie Orthogonale Polarisée (OPS). Ces deux méthodes d'imagerie reposent sur la possibilité de rendre translucide un organe superficiel en l'exposant à une lumière adaptée qui sera réfléchiée par les structures tissulaires. Dans la technologie SDF, 6 diodes électro-luminescentes (LED) projettent une lumière de longueur d'onde unique à 530 nm qui a la particularité d'être absorbée par l'hémoglobine érythrocytaire (figure 8). Les autres structures absorbent cette lumière. Des capteurs CCD réceptionnent la lumière réfléchiée ce qui permet d'obtenir une image en négatif des globules rouges en mouvement, qui contrastent fortement avec le fond blanc de l'image. Seuls les tissus recouverts d'une fine couche épithéliale sont accessibles à l'imagerie SDF, comme les muqueuses qui tapissent la cavité buccale et la face inférieure de la langue. La profondeur de pénétration de la lumière est d'environ 500 µm. La muqueuse buccale présente un intérêt supplémentaire dans la mesure où elle a la même origine embryologique que le péritoine ainsi plusieurs auteurs pensent qu'au même titre que la rétine est le reflet de la circulation cérébrale, la muqueuse sublinguale serait le reflet de la circulation intra-abdominale ^{141, 87}.



Figure 7: Microscan®

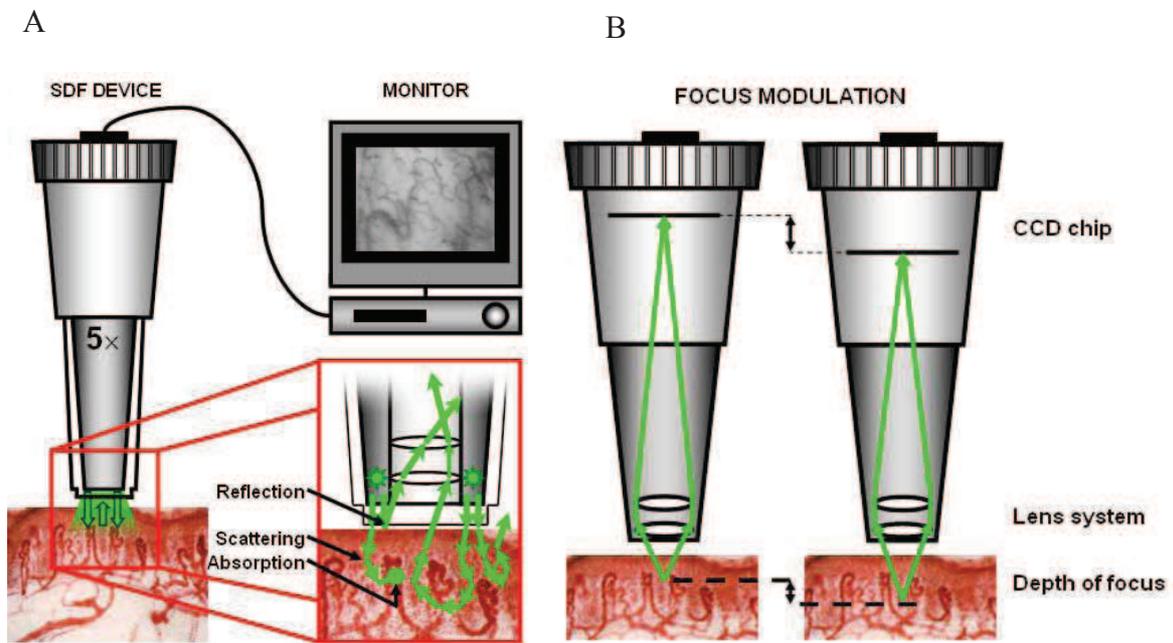


Figure 8: Principe physique du microscan : **A.** émission d'une lumière de 530nanom verte réfléchié par l'hémoglobine. **B.** système optique de mise au point permettant d'explorer une profondeur de 0.5mm .⁵³

2 Principales utilisations

2.1 Etude de la microcirculation sublinguale

Le choc septique est une pathologie complexe pour laquelle il a été mis en évidence que les altérations de la microcirculation étaient essentielles. En effet, dans cette pathologie il est possible d'observer l'apparition de dysfonctions d'organes alors même que les paramètres hémodynamiques ont été stabilisés. A partir de ce constat, est apparu le concept de dysfonction microcirculatoire et par conséquent de réanimation microcirculatoire. C'est en 2001 que de-Backer a montré qu'il existait une altération de la microcirculation sublinguale visualisée de manière non-invasive à l'aide d'une caméra OPS et que cette altération était prédictive d'un mauvais pronostic ¹⁰. Boerma a introduit la notion d'hétérogénéité de perfusion comme élément essentiel de la physiopathologie du choc septique ²⁰.

Par la suite, des équipes se sont intéressées à l'étude de la dysfonction microcirculatoire dans d'autres pathologies telles que l'insuffisance cardiaque sévère ⁴⁴ le HELLP syndrome ³⁵, ou encore les effets des chimiothérapies dans le cadre du myélome ¹⁰¹. De même, plusieurs équipes se sont intéressées à l'étude de la microcirculation sublinguale dans des pathologies ayant un tropisme vasculaire fort telles que les AVC lacunaires ⁷². Les auteurs ont montré une altération significative de la densité des capillaires et de la proportion de capillaires fonctionnels sublinguaux chez les patients ayant un antécédent d'AVC lacunaire. Une étude a également été conduite chez des patients atteints de drépanocytose, cette étude conduite sur 14 malades et 7 contrôles ne retrouvait pas de différence entre la perfusion capillaire des patients pendant une crise vaso-occlusive (CVO) par rapport à leur état de base. toutefois dans cette étude, aucune précision concernant ni la localisation ni la gravité de la CVO n'était rapportée ¹⁴.

L'étude de la microcirculation à l'aide du microscan permet de déterminer plusieurs indicateurs de microcirculation :

Indicateurs de densité

Score de de Backer : il est calculé en délimitant l'image par une grille de 3 par 3 et en dénombrant le nombre d'intersections entre les vaisseaux et la grille (figure 9). Le résultat obtenu est rapporté à la longueur de la grille pour donner une valeur exprimée en nombre d'intersection par mm

Score TVD (total vascular density) : il est calculé en rapportant la somme de la longueur des capillaires sur la surface de l'image.

Indicateurs de perfusion :

Ces indicateurs sont obtenus en attribuant une estimation semi quantitative de perfusion à chaque capillaire. Le flux capillaire est gradé de la façon suivante: 0= Absence de flux (No flow) ; 1= Flux intermittent (Flow no flow) ; 2= Flux lent (Sluggish) et 3= Flux continu (Continuous). Chaque

vaisseau se voit ainsi attribuer un score de flux, permettant de calculer les proportions respectives (en pourcentage) de chaque type de flux dans une séquence donnée.

PPV (proportion of perfused vessels) : il s'agit de la proportion du vaisseau dans lequel le flux est continu ou lent. En revanche un vaisseau est considéré comme non perfusé si le flux est nul ou intermittent (absence de flux pendant plus de 50% du temps)

PVD (perfused vascular density) : il s'agit du produit de la TVD et de la PPV.

MFI (microvascular flow index): LE MFI évalue l'hétérogénéité de la perfusion sur un site donné. Cet index a été validé par l'équipe de Boerma au cours du choc septique²⁰. L'image est divisée en quatre quadrants, et chaque quadrant se voit attribuer, selon le même système semi quantitatif, une note de flux. La valeur de MFI est calculée en faisant la somme des notes des quadrants divisée par quatre.

2.2 Estimation de l'épaisseur du glycocalyx

La visualisation des globules rouges permet d'estimer l'épaisseur du glycocalyx en utilisant le même principe que celui utilisé en microscopie intra vitale. En effet, il est possible de mesurer le diamètre de la colonne de globule rouge avant et après le passage d'un leucocyte qui apparait comme une plage vide (blanche). La différence de diamètre divisée par 2 représente donc l'épaisseur du glycocalyx. Cette technique de mesure est bien corrélée avec la mesure du «gap» en microscopie intra vitale avec opacification de la lumière vasculaire cependant elle sous-estime de manière systématique le glycocalyx¹¹¹.

Ainsi plusieurs équipes ont utilisés l'imagerie SDF pour estimer l'épaisseur du glycocalyx dans diverses conditions pathologiques. Dans le diabète de type 1, il a été montré qu'il existait une altération du glycocalyx par rapport aux témoins et que cette atteinte était plus importante chez les patients avec protéinurie¹¹³. Une autre équipe a montré que le glycocalyx était altéré chez les patients qui avaient un antécédent d'AVC lacunaire par rapport à une population témoin⁹³.

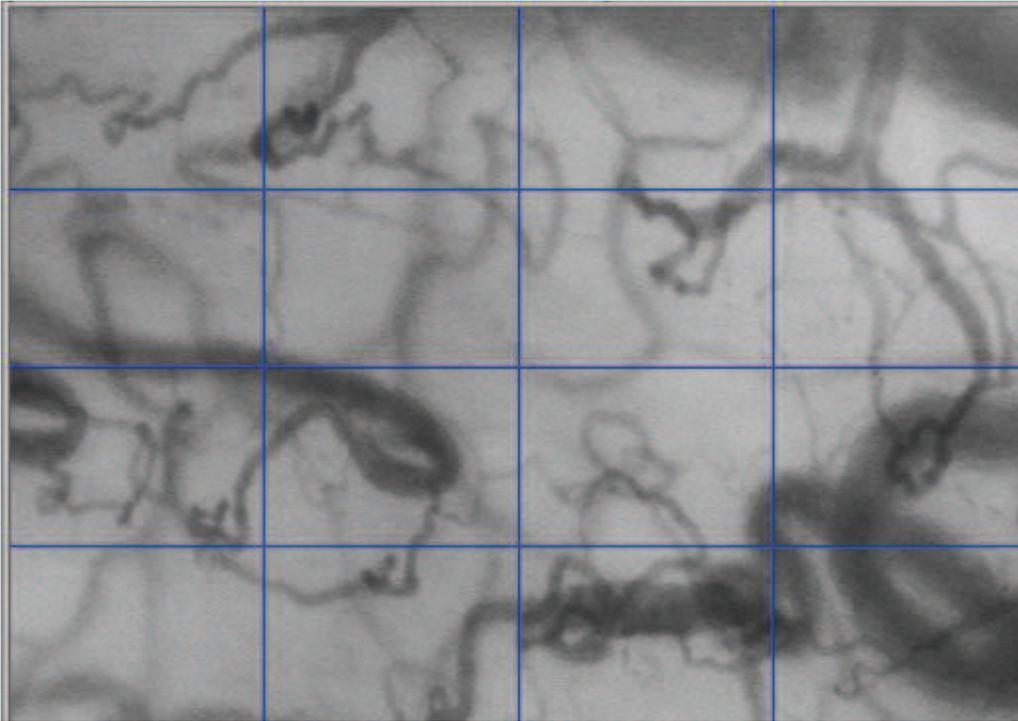
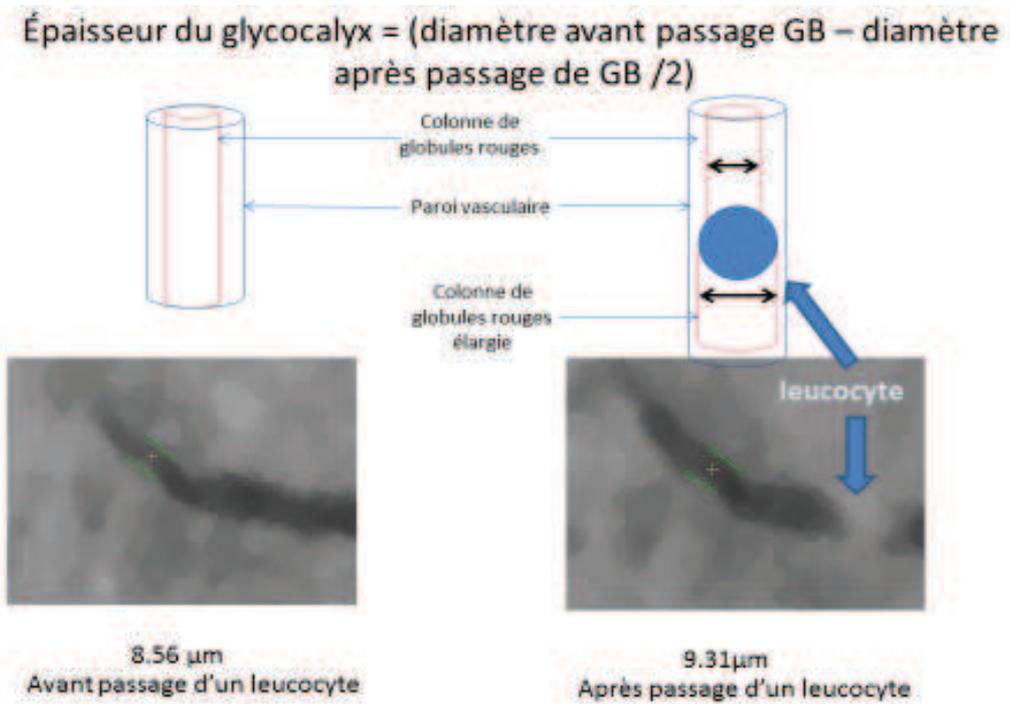


Figure 9 : Visualisation de la microcirculation sublinguale à l'aide d'un Microscan®.



PARTIE III

Utilisation du microscan en médecine interne

Exemple 1 : Mesure du glycocalyx endothélial dans le syndrome des antiphospholipides.

1 Introduction

1.1 SAPL : définitions

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) est une pathologie fréquente caractérisée par l'association de manifestations cliniques thrombotiques (artérielles, veineuses) ou obstétricales et la présence persistante, à au moins douze semaines d'intervalle, d'anticorps antiphospholipides (aPL)¹⁰³. Il s'accompagne également d'une athérosclérose accélérée responsable d'une incidence accrue d'infarctus du myocarde, d'artériopathie périphérique et d'accident vasculaire cérébral. Ces phénomènes expliquent la morbi-mortalité cardiovasculaire élevée des patients atteints¹⁴⁰. Le SAPL peut être isolé (primaire) ou associé (anciennement secondaire), s'intégrant à une pathologie auto-immune comme le lupus érythémateux disséminé. Les aPL constituent une famille hétérogène d'auto-anticorps dirigés contre certains complexes phospholipides-protéines (anticardioline ou ACL) et/ou contre des protéines plasmatiques liant ces phospholipides comme la bêta2-glycoprotéine 1 (β 2Gp1). Ils sont détectés par des tests de coagulation (anticoagulant circulant ou ACC) ou par des tests immunologiques (ACL et/ou anti- β 2Gp1)¹⁰³.

1.2 SAPL et endothélium

Dans les conditions physiologiques, l'endothélium est un « organe » actif répondant à diverses modifications de l'environnement et assurant différentes fonctions comme le contrôle de la vasomotricité, le contrôle de la coagulation et le maintien de l'équilibre local entre les influences pro et anti-inflammatoires. Dans des conditions pathologiques comme le sepsis, l'ischémie-reperfusion et l'athérosclérose, une dysfonction endothéliale peut apparaître. Cette dernière est définie entre autre par l'existence d'une altération des réponses vasomotrices.

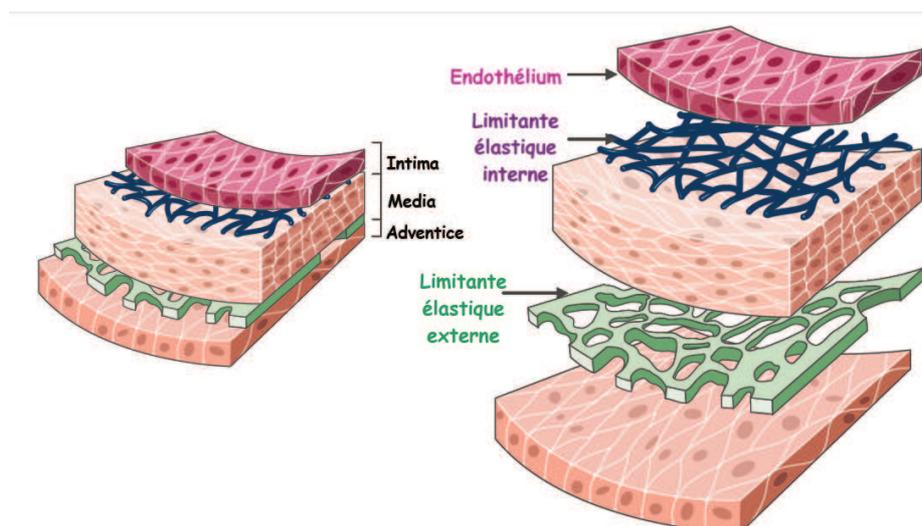
Au plan expérimental l'incubation *ex-vivo* d'aPL en présence de cellules endothéliales d'origine humaine en culture a permis¹¹⁸ de mettre en évidence l'existence d'une dysfonction endothéliale caractérisée par l'apparition d'un phénotype pro-coagulant (surexpression du facteur tissulaire et modulation du système protéine C/S)^{85,73}, pro-inflammatoire (élévation des taux d'IL6, d'IL-1 et de TNF α ¹¹⁹ et pro-adhésif (élévation d'ICAM, VCAM et E-sélectine)^{119,71}. Cette dysfonction endothéliale peut expliquer la survenue clinique de thromboses et contribuer au développement de l'athérosclérose. Récemment, il a été mis en évidence dans un modèle *in-vivo* murin de thrombose

induite au laser, que l'injection d'anti- β 2Gp1 à la souris potentialisait la formation du thrombus ⁵. Enfin, des études cliniques regroupant des formes primaires et secondaires de SAPL ont rapporté une dysfonction endothéliale ^{99,32}.

1.3 Endothélium structure et fonction

1.3.1 Structure et composition des vaisseaux :

L'intima est la partie la plus interne de l'artère, elle est formée par l'endothélium, une monocouche de cellules mononuclées qui recouvre l'ensemble de l'arbre vasculaire. L'endothélium repose sur le sous-endothélium qui est lui-même en contact avec la limitante élastique interne. Les cellules endothéliales sont orientées selon le flux sanguin et ont un rôle physiologique majeur représenté par 3 grandes fonctions : l'adaptation active du diamètre vasculaire en réponse à des stimuli chimiques ou physiques, la régulation de l'hémostase et enfin la contrôle de l'inflammation en modulant l'adhésion des leucocytes et ainsi leur passage du système circulatoire vers leurs sites actifs.



La média est la couche musculaire du vaisseau. Elle est formée de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire dont la composition varie en fonction du site étudié. En effet, les artères dites de conductances de plus gros calibre ont une concentration importante d'élastine qui leur confère une fonction d'amortissement. A l'inverse, les artères de résistances ont un tonus musculaire plus important, la média y est plus riche en collagène de type 3. Les cellules endothéliales produisent localement des médiateurs chimiques dont le NO dont l'action permet le relâchement du tonus des fibres musculaires.

L'adventice est la couche la plus externe des vaisseaux. Elle est séparée de la média par la limitante élastique externe. Elle est composée d'un tissu fibro-élastique de soutien. Elle contient également des éléments vasculo-nerveux qui vont ensuite se ramifier dans la média.

1.3.2 Dysfonction endothéliale

L'endothélium n'est pas une simple barrière anatomique. Il joue un rôle important dans un grand nombre de régulations physiologiques. C'est une structure dynamique capable de répondre à des contraintes physiques et à des stimulations autocrines ou paracrines résultant d'interactions avec des cellules et des molécules circulantes. Cette capacité de l'endothélium à s'adapter aux conditions physiologiques le rend également particulièrement sensible aux modifications pathologiques. Il constitue une première ligne de défense contre les agressions et possède un rôle prédominant dans la régulation de la coagulation, dans la modulation des réponses inflammatoires *via* la régulation de l'adhérence et de l'activation des neutrophiles et des monocytes et surtout dans le contrôle du tonus vasomoteur^{7,48,63}. L'activation de l'endothélium est considérée comme une réponse adaptative normale dont la nature et la durée dépendent du type de stimulus. Chacune de ses activités est régulée dans le temps et dans l'espace. Ce phénomène est connu sous le terme d'hétérogénéité de l'endothélium ou diversité vasculaire.

La dysfonction endothéliale (DE) se caractérise par l'incapacité de la cellule endothéliale à maintenir ses fonctions physiologiques. Les mécanismes de la DE reposent essentiellement sur une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO). Le NO est le principal facteur vasoactif libéré par l'endothélium. Cette diminution de la biodisponibilité du NO résulte d'un déséquilibre entre sa production et sa dégradation. Une diminution de la production du NO peut être secondaire à différents phénomènes : une augmentation de synthèse d'inhibiteurs endogènes, comme la diméthylarginine asymétrique (ADMA)³⁴, Une baisse de l'expression ou une altération des voies de transduction des enzymes responsables de sa production (NO-synthase endothéliale)^{36,97,107}, une diminution en substrat et/ou co-facteur (tétrahydrobioptérine) de ces enzymes³⁶. Une augmentation de la dégradation du NO peut être provoquée par une production excessive d'espèces radicalaires de l'oxygène tel l'anion superoxyde⁵⁷, une diminution de la libération d'autres facteurs endothéliaux vasodilatateurs dérivés de l'acide arachidonique notamment la prostacycline et les acides époxyeicosatriénoïques^{16,17}. Enfin, une production accrue de facteurs vasoconstricteurs tels que la prostaglandine H₂, le thromboxane A₂, l'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine II, peut également "antagoniser" l'action du NO.

Ainsi, la DE est à l'origine d'une altération des réponses vasomotrices mais également d'une augmentation de l'adhésion des cellules inflammatoires (monocytes) et des plaquettes⁷⁵. La diminution du NO entraîne une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion endothéliale (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) en favorisant l'expression et l'activation de la voie du facteur de transcription NF-kb par les espèces réactives de l'oxygène⁹⁴. Une augmentation de l'adhésion des plaquettes à l'endothélium vasculaire est également observée, menant à l'altération de ses propriétés

anticoagulantes. La dysfonction endothéliale responsable d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, joue un rôle important dans les processus inflammatoires, les phases précoces du développement de l'athérosclérose et les processus d'angiogenèse ¹¹⁷. Enfin, cette dysfonction s'accompagne de lésions structurales responsables de la production de microparticules apoptotiques d'origine endothéliale véhiculant des signaux inflammatoires et oxydatifs qui favorisent le développement de l'athérosclérose ^{123,139}.

2 Matériels et méthodes

2.1 Population

Les sujets inclus dans cette étude sont issus d'une cohorte de patients ayant participé à une évaluation vasculaire au sein de l'unité de pharmacologie clinique (*Clinical Trial Registration Information*. URL: <https://eudract.ema.europa.eu>; numéro d'identification : RCB2010-A00708-31).

Les patients de cette cohorte ont été sélectionnés à partir de la file active de patients suivis pour un SAPL dans le service de médecine interne au CHU de Rouen. Les principaux critères d'inclusions étaient un âge supérieur à 18 ans et inférieur ou égal à 75 ans et avoir un SAPL artériel primaire répondant aux critères de classification de Sydney ¹⁰³.

Les patients porteurs d'un SAPL non artériel ou secondaire, d'une maladie athéromateuse symptomatique: (Infarctus du myocarde, angor, revascularisation coronarienne, accident vasculaire cérébral constitué ou transitoire, artérite oblitérante des membres inférieurs.) d'une Insuffisance cardiaque et/ou valvulopathie significative, d'une hypertension artérielle secondaire ou sévère (PAD \geq 110 mm Hg et/ou PAS \geq 180 mm Hg), d'une fibrillation auriculaire, d'un diabète diagnostiqué cliniquement ou glycémie à jeun $>$ 1,26 g/l d'une insuffisance rénale chronique sévère, d'une obésité ou d'une grossesse en cours ont été exclus.

En plus des données démographiques, les paramètres colligés pour cette étude comprenaient:

- Des paramètres de fonction endothéliale avec notamment la mesure de la dilatation de l'artère humérale en réponse à une épreuve d'hyperhémie induite par une ischémie
- Un dosage biologique des marqueurs de l'inflammation (TNF alpha).
- Une évaluation des paramètres d'hémostase avec le dosage du facteur tissulaire (FT).
- Une évaluation du niveau de stress oxydant en mesurant les nitrites plasmatiques et les TBARS.

Parmi ces patients nous avons effectué une mesure directe de l'épaisseur du glycocalyx chez 5 patients et 5 témoins déterminés au hasard et qui étaient disponibles.

2.2 Évaluation du glycocalyx

2.2.1 Dosage des composés circulants

Le dosage des composés circulant du glycocalyx a été effectué à partir du sérum de patients issu de la sérothèque de l'étude princeps. Le syndecan-1 a été dosé à l'aide d'un kit commercial Syndecan (CD138) Human ELISA Kit abcam®, l'acide hyaluronique a également été dosé à l'aide d'un kit ELISA (Hyaluronan Quantikine ELISA Kit) R&D systems® les plaques ont ensuite été lues par un lecteur ELx800 BIOTEK®.

2.2.2 Mesure de l'épaisseur du glycocalyx par Microscan®

La caméra permettant l'enregistrement de la microcirculation sublinguale est un microscan® de la société Microvision Médicale (Pays Bas). Le Microscan® était connecté à un ordinateur portable dédié aux explorations microcirculatoires (acer aspire) du service de médecine interne. L'acquisition des images a été effectuée grâce au logiciel AVA 3.2 développé par Microvision médicale. Le traitement des images a été effectué avec le logiciel ImageJ 1.48c (wayne Rasband national institutes of health, USA) et la mesure du glycocalyx a été effectuée à l'aide du plug-in « *vessel width* » développé par Sasu Liuhanen et *al.* ⁸⁴

Toutes les vidéos ont été enregistrées dans les mêmes conditions par un seul opérateur pour limiter les différences de mesures interindividuelles. Chaque sujet était en position assise au repos et au calme dans une pièce à température ambiante contrôlée. La lancette stérile du microscan® a été placée à environ 90° sous la langue en limitant la pression après que la salive ait été absorbée par une compresse stérile pour améliorer la qualité de l'image. La mise au point était effectuée manuellement avant de débiter un enregistrement de 20 secondes comme recommandée ¹¹¹. Cinq passages de leucocytes ont été enregistrés pour chaque patient sur des sites différents conformément aux recommandations d'utilisation. Les vidéos ont été stabilisées à l'aide du logiciel AVA 3.2 et seules les séquences de meilleures qualités ont été retenues. Ces séquences ont été enregistrées au format AVI puis ouvertes avec le logiciel image J. Le principe de mesure repose sur la mesure de la colonne de globule rouge avant et après le passage d'un leucocyte.

Nous avons utilisé deux techniques de mesures différentes

- Une mesure dite manuelle : le capillaire dans lequel passe un leucocyte est identifié par un astérisque. On effectue ensuite un grossissement numérique *600. Une mesure du diamètre est effectuée avant le passage du globule blanc puis au même endroit juste après le passage de celui-ci.

- Une mesure semi-automatique : chaque capillaire était identifié. Le programme estimait alors les limites du vaisseau en fonction des différences de contraste puis il mesurait la distance

maximale entre les 2 lignes tracées. Cette opération était effectuée avant et après le passage d'un leucocyte. Pour obtenir des résultats reproductibles et proches du diamètre réel du vaisseau, un angle maximum de 5° entre les deux lignes tracées a été retenu.

2.2.3 Choix du capillaire et du leucocyte d'intérêt

Les leucocytes apparaissaient comme une zone claire au sein de la colonne sombre de globules rouges. Les mesures ont été effectuées 1 seconde (soit 25 frames) environ après le passage d'un autre leucocyte pour permettre au glycocalyx de se « ré-expandre ». Les capillaires choisis ont un diamètre d'environ 7-12µm.

2.2.4 Statistiques

Les statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5®. Pour les comparaisons de moyennes, un test t de Student a été utilisé. Les variables quantitatives ont été comparées à l'aide du test de Fischer avec un P considéré comme significatif pour des valeurs < à 0.05. Les corrélations ont été effectuées avec un test de Spearman.

3 Résultats

3.1 Population

Les patients étaient au nombre de 32 dont 15 SAPL et 17 témoins. Les patients et les témoins ne présentaient pas de différence significative concernant l'âge, le sexe ou encore les principaux facteurs de risque cardiovasculaires. Il était noté cependant une prévalence plus forte de l'hypertension artérielle avec 40% de patients hypertendus dans le groupe de patients suivis pour SAPL, sans toutefois atteindre le seuil de significativité.

Tous les patients inclus étaient atteints d'un SAPL artériel, la principale manifestation clinique était cérébrovasculaire pour 9 d'entre eux, 2 patients avaient présenté un infarctus du myocarde. Les autres manifestations thrombotiques étaient une thrombose aortique, une ischémie rétinienne, une ischémie digitale et enfin un infarctus splénique. Au sein de cette population, un anticoagulant circulant était retrouvé dans 7 cas, les anticardiolipines IgG ou IgM étaient présents chez respectivement 12 et 11 patients. Enfin les anticorps anti β2Gp1 IgG et IgM étaient dépistés chez 3 malades. Dix patients avaient une simple positivité, 4 avaient une double positivité, un seul avait une triple positivité.

Un traitement anticoagulant était prescrit chez 14 des 15 patients suivis pour un SAPL. La moitié d'entre eux était traitée par des statines, 27% recevaient un IEC et 20% un antiagrégant plaquettaire. Aucun patient ne recevait d'hydroxychloroquine.

Une différence significative concernant les paramètres d'inflammation (TNF α), de stress oxydant (nitrites, TBARS) ou d'élévation du facteur tissulaire était observée entre les patients SAPL et ceux du groupe contrôle. Une altération significative de la FMD chez les patients atteints de SAPL comparativement aux contrôles était mesurée.

	SAPL n=15	TEMOIN n=17	P
Données épidémiologiques			
Sexe H %	47	30	0.46
âge	46.3+/-16.6	41.5+/-12.0	0.38
Facteurs de risque cardiovasculaires			
IMC	24.6+/-3.5	23.5+/-2.5	0.35
tabac (%)	27	7	0.33
LDL (mmole/L)	3.03+/-0.9	3.2+/-0.6	0.63
HTA(%)	40	0	0.05
Diabète(%)	0	0	
Traitements associés			
statine	53.3	0	<0.01
AAP	20	0	0.25
AVK	93	0	<0.01
IEC	27	0	0.12
Marqueurs d'athérosclérose précoce et de dysfonction endothéliale			
IMT carotidien	0.521+/-0.13	0.42+/-0.07	<0.01
FMD %	5.74+/-0.51	7.5+/-1.4	<0.01
TBARS	0.73+/-0.27	0.51+/-0.21	0.01
TNF α ng/L	2.0+/-1.07	1.41+/-0.60	0.04
Facteur tissulaire	81.74+/-30.61	63.41+/-36.27	0.09

Tableau 3: Caractéristiques de la population

Les valeurs quantitatives sont exprimées en moyenne +/- déviation standard. Les variables qualitatives sont exprimées en pourcentage (%) ; Un degré de significativité ($p < 0.05$) a été retenu

3.2 Evaluation du glycoalyx par dosage des composés sériques.

3.2.1 Taux circulants de syndecan-1 et acide hyaluronique (figure 10).

Le syndecan-1 était mesuré à 39.3 ± 19.5 ng/ml dans le groupe SAPL contre 19.1 ± 13 ng/ml dans le groupe témoin ($p < 0.01$). Le taux d'acide hyaluronique était mesuré à 6.47 ± 4.48 ng/ml dans le groupe SAPL contre 6.15 ± 3.86 ng/ml dans le groupe témoin ($p = 0.84$).

3.2.2 Corrélation entre les marqueurs circulants et les paramètres endothéliaux

Une corrélation significative entre les taux de syndecan-1 circulants et l'altération de la FMD ($p < 0.01$) et l'épaisseur intima média ($p = 0.01$) a été mesurée. De même, il existe une corrélation significative avec le taux de facteur tissulaire sérique ($p < 0.01$). En revanche aucune corrélation entre ces paramètres et les taux circulants d'acide hyaluronique n'a été objectivée, ni même entre les taux circulants de syndecan-1 et les taux de TNF α .

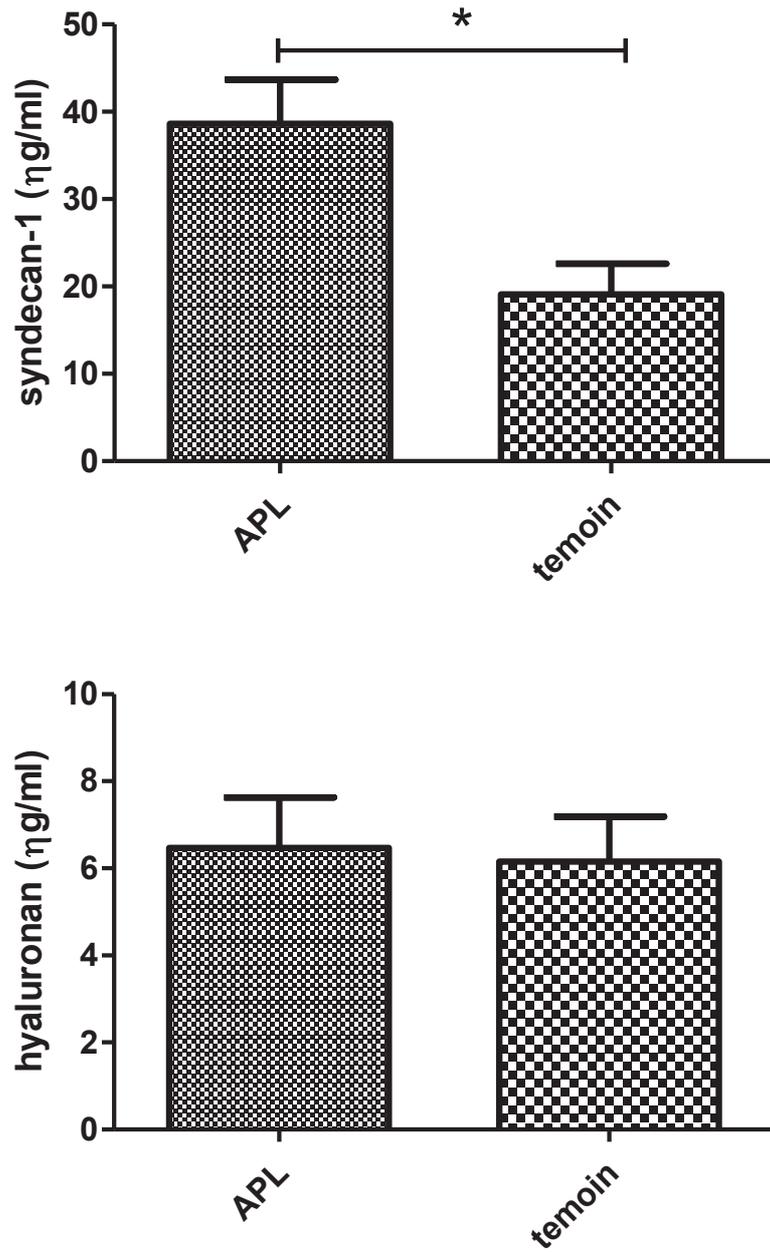


Figure 10 : Taux sériques de syndecan-1 et d'acide hyaluronique chez les patients atteints de SAPL et les témoins.

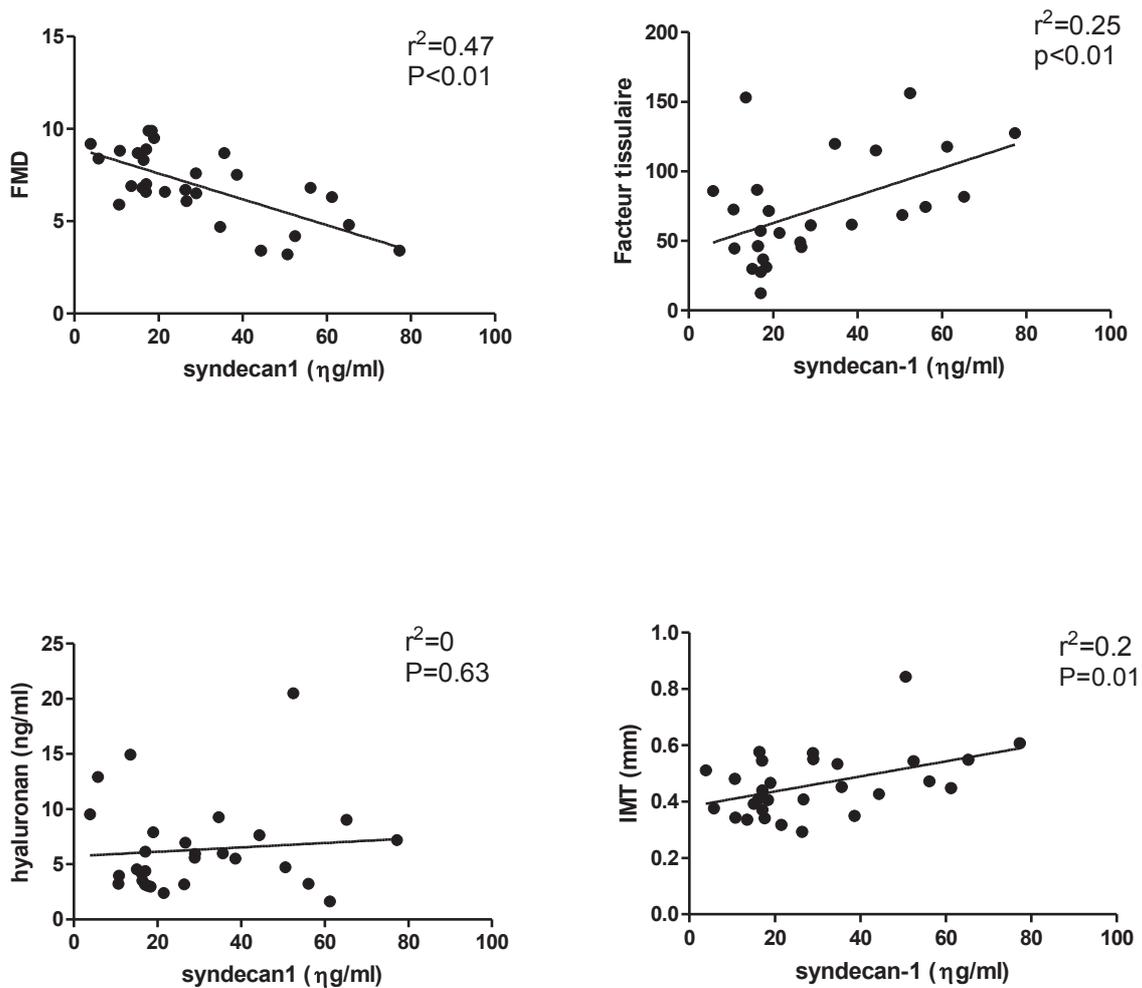


Figure 11 : Corrélations entre les paramètres vasculaires et les composants du glycoocalyx

3.2.3 Mesure de l'épaisseur du glycoocalyx dans un sous-groupe de 5 malades et 5 témoins (tableau 5).

L'épaisseur moyenne du glycoocalyx était de $0.14 \pm 0.16 \mu\text{m}$ dans le groupe SAPL et de $0.79 \pm 0.26 \mu\text{m}$ dans le groupe témoin en utilisant la technique de mesure semi-automatique ($p < 0.01$). En utilisant la technique de mesure manuelle, l'épaisseur de glycoocalyx était mesurée à $0.19 \pm 0.24 \mu\text{m}$ dans le groupe SAPL et à $0.78 \pm 0.18 \mu\text{m}$ dans le groupe témoin ($p = 0.002$).

		SAPL n=5	TEMOIN n=5	P
		Moyenne \pm DS	Moyenne \pm DS	
épaisseur du glycoocalyx (μm)	manuelle	0.19 ± 0.24	0.78 ± 0.18	<0.01
	semi-automatique	0.14 ± 0.16	0.79 ± 0.26	<0.01

Tableau 4: Epaisseur du glycoocalyx

4 Discussion

Cette étude préliminaire est à notre connaissance la première à évaluer le glycocalyx au cours du SAPL. Il s'agit d'une nouvelle approche de l'exploration de l'endothélium au cours du SAPL qui fait suite à nos travaux cliniques et expérimentaux dans cette thématique.

L'altération du glycocalyx mise en évidence dans cette étude s'intègre parfaitement avec les données actuelles démontrant l'existence d'une dysfonction endothéliale au cours du SAPL^{118,18,32}. Ainsi, le glycocalyx pourrait en présence d'une élévation du niveau de stress oxydant ou d'une agression inflammatoire de l'endothélium perdre ses propriétés anti thrombotiques, anti adhésives mais également son action de protection mécanique vis-à-vis des surfaces cellulaires endothéliales permettant ainsi aux aPL de se fixer sur les membranes cellulaires. L'ensemble de ces modifications conduirait à l'activation des cellules endothéliales et à l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la libération de médiateurs inflammatoires et à une augmentation de l'expression du facteur tissulaire responsable de la survenue de thromboses.

Dans cette étude, l'élévation du taux de syndecan-1 et la diminution de l'épaisseur du glycocalyx sont des arguments forts de l'altération du glycocalyx. En revanche nous n'avons pas retrouvé d'augmentation du taux d'acide hyaluronique circulant avec des taux qui paraissent faibles par rapport à ceux rapportés dans la littérature pour des malades diabétiques ou insuffisants rénaux. Ce résultat est surprenant dans la mesure où l'élévation du taux sérique d'acide hyaluronique est un témoin reconnu de stress endothélial que ce soit dans des modèles murins d'agression aigüe^{28,27} ou bien dans des situations chroniques^{110,81}. De plus, son rôle protecteur dans la progression de l'athérosclérose est parfaitement établi puisque l'inhibition pharmacologique de la production d'acide hyaluronique est responsable dans un modèle murin d'une athérosclérose accélérée²⁸. Or, nous avons retrouvé dans notre cohorte comme décrit dans la littérature³² la présence de signes d'athérosclérose infra clinique (augmentation de l'épaisseur intima média), et une altération de la fonction endothéliale. L'une des explications plausibles serait la surreprésentation de patients SAPL traités au long cours par des statines. L'effet de cette classe médicamenteuse sur le glycocalyx n'a pas été étudié, en revanche il semble que parmi leurs effets pléiotropes, les statines interfèrent avec le métabolisme de l'acide hyaluronique. En effet, les statines ont un effet inhibiteur des protéines Rho-A qui sont l'une des voies de signalisation intracellulaire du récepteur CD44 de l'acide hyaluronique. Ainsi le blocage de Rho-A bloque la formation de filaments d'actine de stress et la disjonction des cellules endothéliales⁷⁹),¹²¹. L'effet des statines sur le métabolisme et sur la transduction du signal intracellulaire reste encore largement à découvrir.

Malgré l'effectif restreint, une corrélation significative entre les mesures de glycocalyx et

celles de la FMD, marqueur reconnu comme étant à ce jour l'indicateur clinique le plus robuste de dysfonction endothéliale a pu être établie. Il est évidemment impossible de faire un lien de causalité entre l'altération de la FMD et l'atteinte supposée du glycocalyx du fait des nombreux facteurs de confusion pouvant biaiser notre étude. En revanche, ce résultat est concordant avec celui décrit de manière expérimentale par une équipe japonaise qui retrouvait que la production de NO en réponse à une augmentation de flux sanguin dans une artère fémorale de chien était altérée après destruction enzymatique du glycocalyx ¹⁰⁴. Également, une étude récente conduite sur une lignée de cellules endothéliales déficientes pour le gène codant pour le syndecan-1 retrouvait une absence d'augmentation de l'expression de la NOS endothéliale (eNOS) lors de l'exposition à un flux laminaire ¹⁴⁵. Cette dernière donnée est également concordante avec des travaux déjà menés par notre équipe puisque nous retrouvions, dans un modèle murin de SAPL, une diminution de l'expression de la eNOS ¹⁰².

Par ailleurs, les taux de syndecan-1 mesurés dans notre population étaient également corrélés avec un paramètre d'athérosclérose infra clinique, l'épaisseur intima média. Ce résultat est concordant avec ceux d'une étude portant sur des patients qui montrait également une corrélation positive entre les composés circulants du glycocalyx et l'épaisseur intima média carotidienne des patients ¹¹⁰.

Nos résultats mériteront d'être bien évidemment confirmés dans une cohorte plus conséquente mais également par des mesures des enzymes responsables de la dégradation du glycocalyx telles que les héparanases. De même, il sera indispensable de poursuivre la mesure du glycocalyx et d'effectuer des mesures en aveugle avec plusieurs lectures par des intervenants différents afin de minimiser les biais de mesure et d'interprétation.

Parmi les limites de cette étude, il est important de souligner le nombre important de patients hypertendu dans le groupe SAPL. Cette différence est cohérente avec les données de la littérature concernant le sur-risque de thrombose artérielle des patients souffrant d'HTA ^{43,52,127}. En revanche, il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée concernant le retentissement de l'hypertension artérielle sur le glycocalyx endothélial. Nous ne pouvons donc pas exclure que l'HTA soit un facteur cofondant dans cette étude, ce d'autant que l'effectif est trop restreint pour réaliser des analyses avec ajustement sur ce paramètre.

EXEMPLE 2 : Etude de la microcirculation sublinguale dans la sclérodermie systémique

1 Introduction

1.1 Présentation générale et épidémiologie

La sclérodermie systémique (ScS) est une maladie auto-immune non spécifique d'organe caractérisée par une vasculopathie atteignant les petits vaisseaux, par la présence d'auto-anticorps spécifiques et par une dysfonction des fibroblastes responsable d'une production excessive de matrice extracellulaire conduisant à la fibrose tissulaire puis à la dysfonction d'organe. Le pronostic de la ScS dépend essentiellement du type des organes atteints, ainsi les atteintes rénales, pulmonaires et vasculaires en font toute sa sévérité.

1.2 Classifications

La sclérodermie est une maladie rare et d'expression variable selon les individus atteints, ce qui rend l'établissement de critères de classification difficile. Plusieurs classifications ont été proposées afin de permettre d'homogénéiser les publications et de mettre en place des essais thérapeutiques. La première classification date de 1981 publiée par l'ACR qui n'incluait pas les patients avec une atteinte cutanée distale. Par la suite, Leroy en 1988 a proposé une classification prenant en compte l'extension de la fibrose cutanée en individualisant la forme diffuse de la forme limitée qui respecte la partie proximale des membres. En 2001, cette classification a été enrichie par la notion d'atteinte débutante «early SSc» qui reposait sur la présence d'anomalies capillaroscopiques, d'auto-anticorps spécifiques et d'un phénomène de Raynaud ⁸⁰. Cette classification a été validée en 2008 par Koenig qui retrouvait que dans ce groupe de patients présentant une atteinte précoce, 79% d'entre eux développaient une sclérodermie confirmée dans les 15 ans ⁷⁶. Actuellement ces critères ont une valeur diagnostique notamment pour le diagnostic précoce.

Récemment l'ACR et l'EULAR ont proposé une nouvelle classification qui reprend les principaux éléments cliniques avec un poids particulièrement important pour la sclérose cutanée qui, si elle s'étend au-delà des articulations métacarpo-phalangiennes de manière bilatérale suffit pour définir la sclérodermie ⁶². On ne retrouve par contre pas la distinction des formes limitées et diffuses, ni la notion de sclérodermie précoce. Cette classification a été validée sur un groupe de patients et améliore les performances des précédentes classifications avec une sensibilité de 91 % et

une spécificité de 92% contre 71% et 72% pour les anciens critères. Cependant, il faut noter que les patients qui répondaient à la définition de sclérodémie précoce selon les critères de Leroy de 2001 n'atteignent pas le seuil permettant de retenir le diagnostic de SSc dans la nouvelle classification.

1.3 Physiopathologie

1.3.1 Atteintes micro vasculaires

L'atteinte vasculaire semble être très précoce dans l'histoire naturelle de la maladie comme en témoigne l'existence d'un phénomène Raynaud précédant souvent de plusieurs années l'apparition d'un phénotype clinique évocateur. Elle peut être mise en évidence dans l'ensemble des organes atteints (reins, poumons, cœur). L'organe le plus accessible est la peau au niveau de laquelle il est possible de visualiser ces altérations à l'aide d'un vidéocapillaroscope qui révèle des altérations architecturales et une raréfaction capillaire conduisant à une hypoxie tissulaire.

1.3.1.1 Altération de l'angiogénèse et de la vasculogénèse

L'angiogénèse normale est un processus très finement régulé par une balance entre des agents pro-angiogéniques et des substances anti-angiogéniques. Les cellules endothéliales lorsqu'elles reçoivent un signal en faveur de l'angiogénèse sécrètent des enzymes protéolytiques visant à détruite la membrane basale ainsi que la matrice extracellulaire. Puis ces cellules activées migrent dans l'espace péri vasculaire et s'y développent pour former un vaisseau primaire non fonctionnel. Vient ensuite une étape de tubulation et de stabilisation par recrutement de péricytes. Plusieurs de ces étapes semblent altérées chez les patients souffrant de sclérodémie ⁸⁹. Ainsi il existe des taux anormalement élevés d'endostatine qui est un puissant inhibiteur de l'angiogénèse dans la peau des patients ⁴⁵. Chez les individus sains, l'hypoxie tissulaire est un stimulus majeur qui active l'angiogénèse *via* l'expression du facteur de transcription HIF1 α . Celui-ci induit la transcription de grandes quantités de VEGF qui tient un rôle central dans l'induction de l'angiogénèse. De manière contradictoire alors qu'il existe dans la peau des patients sclérodermiques une hypoxie sévère, une élévation de la transcription de HIF1 α et des taux circulants de VEGF élevés, l'angiogénèse y est insuffisante. Plusieurs hypothèses ont été émises :

(a) défaut de réponse des cellules endothéliales au VEGF soit en lien avec l'acquisition d'un profil de résistance soit du fait de l'apparition d'anticorps anti-VEGF,

(b) le VEGF retrouvé en excès serait un variant issu d'un épissage alternatif, le VEGF165b qui aurait des propriétés anti-angiogéniques ^{90,91},

(c) la balance entre les facteurs pro et anti-angiogéniques resterait défavorable malgré la surexpression de VEGF ⁹⁶.

La vasculogénèse est un mécanisme de création de nouveaux vaisseaux à partir de cellules endothéliales progénitrices (EPC). Les EPC sont définies comme des cellules circulantes immatures caractérisées par leur origine médullaire et leur tropisme pour les sites de néovascularisation. Leur présence témoigne de la régénération vasculaire. Les progéniteurs sont capables de générer *in vitro*, des colonies endothéliales à fort potentiel de prolifération et de participer à la croissance vasculaire ou à la réparation de l'endothélium selon un processus de vasculogénèse⁸. La mise en circulation de ces cellules est favorisée par des cytokines et des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF. Ce processus de vasculogénèse semble également être altéré dans la sclérodermie systémique. Tout d'abord, la diminution du nombre d'EPC circulantes semble corrélée avec la durée d'évolution de la sclérodermie ainsi qu'avec des atteintes d'organes telles que l'atteinte cardiaque, l'hypertension artérielle pulmonaire et la raréfaction capillaire. Enfin, la durée de vie de ces progéniteurs est plus faible du fait d'une apoptose induite par le sérum des patients suggérant un rôle des anticorps¹⁵¹. De plus les EPC expriment de manière constitutive le programme de mort favorisant l'apoptose¹⁰⁸.

1.3.1.2 Dysfonction endothéliale et peptides vasoactifs

La ScS s'associe également à une dysfonction endothéliale précoce comme en témoigne une altération de la vasodilatation endothélium dépendante médiée par le flux et une corrélation entre l'altération de cette FMD et la gravité de l'atteinte capillaire en capillaroscopie⁷⁸. Au plan biologique, les molécules de la coagulation telles que le facteur Willebrand et la thrombomoduline ont également été retrouvées augmentées au cours de la ScS^{70, 114}. Enfin, l'endothéline-1(ET-1) joue un rôle crucial dans la pathogénie de la ScS. De nombreux travaux ont montré que les taux plasmatiques d'ET-1 étaient élevés au cours de la ScS, qu'ils étaient corrélés au degré de sévérité de l'atteinte vasculaire périphérique et que l'ET-1 stimulait la production de matrice extracellulaire par les fibroblastes constituant ainsi un des liens entre les anomalies vasculaires et pro-fibrotiques caractéristiques de la ScS^{69, 135}. Outre ses effets mitogènes, pro-fibrosants et vasoconstricteurs, l'ET-1 favorise l'apoptose des cellules endothéliales⁸⁶. L'utilisation de bloqueurs mixtes des récepteurs de l'ET1 s'est avérée bénéfique dans l'hypertension artérielle pulmonaire liée à la maladie comme dans la prévention des ulcères cutanés bien que leur bénéfice dans la progression de la fibrose interstitielle pulmonaire reste discuté^{67, 138}.

1.3.2 Une maladie auto-immune

1.3.2.1 Immunité humorale

La présence d'anticorps dirigés contre les antigènes du soi est connue depuis les années 1960 avec la découverte d'anticorps antinucléaire. Les cibles de ces anticorps sont variables en fonction du type de sclérodermie. Leur recherche par immunofluorescence puis la recherche de leur spécificité

par ELISA permet d'individualiser plusieurs anticorps

-Fluorescence mouchetée/homogène : anti Scl70 (anti-topoisomerase 1)

-Fluorescence centromère : protéine CEN A, CEN B

-Fluorescence nucléolaire : anti PM/Scl, anti polymérase I, II ou III, anti Th/To, anti fibrilline/U3 ribonucleoprotein.

La pathogénicité de ces différents anticorps est peu connue. En revanche, ils ont un rôle dans le diagnostic puisque la présence d'anti scl70 ou d'anti centromère est fortement prédictive du développement d'une sclérodémie systémique chez les malades atteints d'un phénomène de Raynaud ⁷⁶. Ces auto-anticorps ont également une prévalence différente selon que les patients sont atteints d'une forme diffuse ou d'une forme limitée (figure12)



Figure 12 Type d'atteinte cutanée selon le profil des auto-anticorps ⁶¹

D'autres auto-anticorps ont été mis en évidence, parmi lesquels les anticorps anti-cellule endothéliale (AECA) dont la prévalence varie de 22 à 86% selon les séries ¹⁰⁰. Des associations entre leur présence et des atteintes vasculaires périphériques et pulmonaires ont été observées ⁶⁴. Cependant, le rôle pathogène de ces anticorps reste encore à déterminer précisément en clinique même si les cibles antigéniques sont connues (topoisomérase-1 et CENP-B) ^{51,125}. Néanmoins, des travaux expérimentaux sur des lignées de cellules endothéliales ont démontré que l'incubation de ces cellules en présence des AECA induisait une production importante des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et sélectine E, ainsi que d'ET-1 ^{26,148} expliquant en partie leur implication dans la pathogénie de la ScS. De plus, les AECA induisent dans des modèles animaux de sclérodémie, une apoptose des cellules endothéliales ^{126,147}.

Enfin, des anticorps dirigés contre les fibroblastes ont été découverts et auraient un rôle dans l'activation des fibroblastes et dans la production de cytokines pro inflammatoires et de molécules d'adhésions. Récemment des anticorps dirigés contre le récepteur au PDGF ont été mis en évidence dans le sérum de patients sclérodermiques, sans donnée spécifique quant à leur rôle pathogène.

1.4 Principales atteintes d'organe

Les principales atteintes cliniques de la sclérodermie sont résumées dans le tableau 6. Les atteintes vasculaires primitives sont à distinguer des atteintes fibrosantes. Le phénomène de Raynaud est à individualiser car il s'agit d'une manifestation non spécifique de la sclérodermie, bien que présent dans plus de 90% des cas. Souvent inaugural, il peut précéder l'ensemble des autres manifestations cliniques de plusieurs années. Il s'agit d'un acrosyndrome paroxystique se manifestant au froid et atteignant principalement les mains, parfois les pieds, le nez et les oreilles dans les formes sévères. Le syndrome de Raynaud se reconnaît cliniquement par ses trois phases, syncopale, asphyxique et érythrmalgique, la dernière étant inconstante.

Atteinte d'organe	Atteintes fibrosantes	Atteintes vasculaires
Peau	Sclérodactylie, limitations de l'ouverture buccale,	Phénomène de Raynaud, ischémies digitales, télangiectasies
Tube digestif	RGO, troubles de la motilité (pseudo occlusion troubles de la vidange gastrique)	Télangiectasies, ectasies gastriques vasculaires antrales (GAVE)
Poumon	Fibrose pulmonaire interstitielle	HTAP
Rein		Crise rénale sclérodermique
Cœur	Insuffisance cardiaque diastolique	

Tableau 5: Principales atteintes d'organes de la sclérodermie systémique

1.5 Explorations microcirculatoires dans la sclérodermie

1.5.1 Capillaroscopie

La capillaroscopie s'est imposée comme un outil diagnostique depuis les années 60 avec la description d'anomalies caractéristiques. Il aura cependant fallu attendre la classification de 2001, pour voir apparaître les anomalies capillaroscopiques comme critères de classification de la maladie. L'équipe italienne de Cutolo s'est efforcée depuis les années 2000 à montrer qu'il existait plusieurs stades d'altération de la capillaroscopie (figure 12) avec :

-Un stade dit «précoce» comprenant simplement des anomalies morphologiques des capillaires sans raréfaction ni ramification témoignant d'un processus débutant.

-Un stade «actif» au sein duquel sont classés les malades ayant de nombreux méga capillaires, des hémorragies mais sans raréfaction.

-Un stade «tardif» au sein duquel une raréfaction des capillaires jusqu'à la constitution de plages désertes mais aussi des capillaires très ramifiés sans dilatation ni hémorragie témoignant d'un processus de néo-angiogenèse réactionnelle sont observés³⁸.

Cette même équipe a démontré que le profil capillaroscopique était différent selon le type de sclérodermie (limitée ou diffuse) et selon le type d'auto-anticorps présent. Ainsi, les patients porteurs d'anticorps anti Scl70 ou atteints d'une forme diffuse auraient plus fréquemment un profil capillaroscopique actif ou tardif, alors que ceux porteurs d'anticorps anti-centromère ou atteints d'une forme limitée auraient plus souvent des formes précoces³⁷.

Par ailleurs, Sulli *et al.* ont développé un score composite calculé à partir de la somme des évaluations semi quantitatives de la densité capillaire, de la désorganisation et de la raréfaction capillaire. Ce score semble corrélé avec la durée d'évolution de la maladie ainsi qu'avec l'augmentation du score de Rodnan et l'épaisseur de la peau mesurée en échographie haute fréquence^{134, 132}.

La capillaroscopie présente également un intérêt pour la prédiction des atteintes d'organes. En effet, la densité capillaire en capillaroscopie a été corrélée avec l'importance de l'hypertension artérielle pulmonaire⁶⁰. Parallèlement, les patients au stade tardif ont un risque plus important de développer des ulcères digitaux que les patients au stade précoce (OR 5.74; 95% CI 2.08–15.89)²⁴.

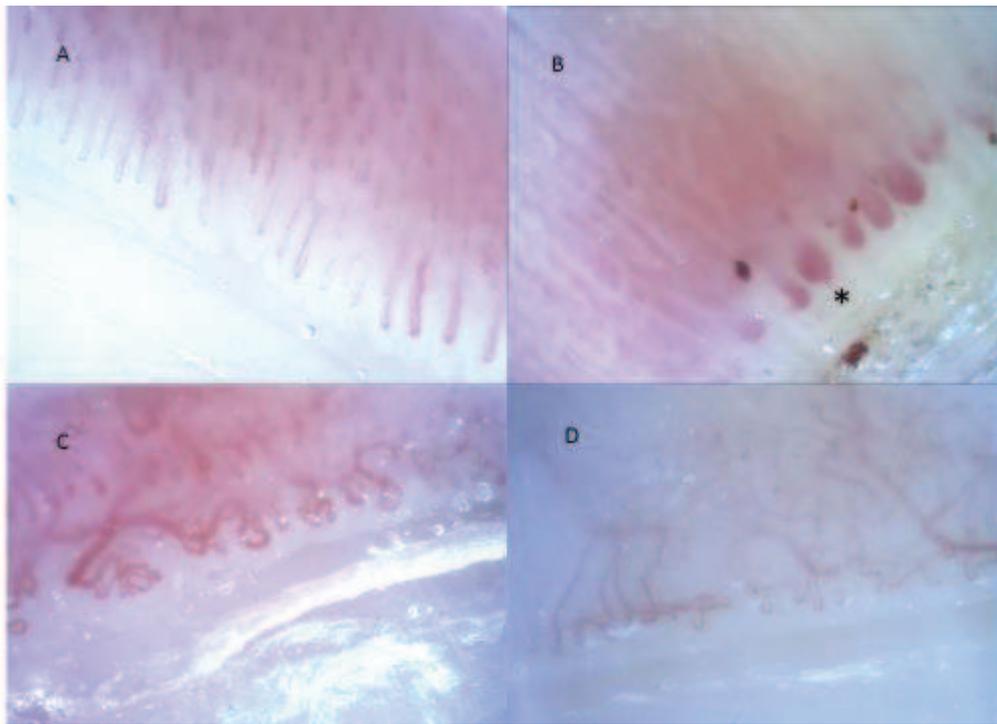


Figure 13 : Exemples de capillaroscopie :

A stade précoce avec présence d'une densité capillaire normale, quelque dilatations d'anses capillaires, **B.** phase active avec présence de nombreux mégacapillaires(*) d'hémorragies et une densité peu diminuée **C et D** phases tardives avec importantes dystrophie, ramifications et raréfaction capillaires.

1.5.2 Explorations fonctionnelles

Alors que la capillaroscopie permet d'explorer la morphologie des capillaires, il est également possible d'estimer leur fonction à l'aide des techniques telles que le laser Doppler ou encore la thermographie. Ces deux techniques permettent de distinguer avec justesse dans 72% des cas, les patients atteints de maladie de Raynaud ou de sclérodémie systémique¹⁰⁶. Une étude récente a montré une altération plus importante du flux enregistré en laser Doppler dans les sclérodémies en phase tardive comparativement à celui enregistré dans les formes précoces¹³³. Dernièrement, une nouvelle modalité d'exploration de la fonction endothéliale a vu le jour, elle repose sur le couplage entre l'étude de la perfusion digitale par laser Doppler avec une technique d'administration pharmacologique transcutanée, l'iontophorèse. Ainsi une équipe a montré qu'il était possible d'étudier la vasoréactivité endothélium-dépendante et indépendante *via* l'iontophorèse d'acétylcholine et de nitroprussiate de sodium au niveau des mains de patients atteints de sclérodémie systémique⁴.

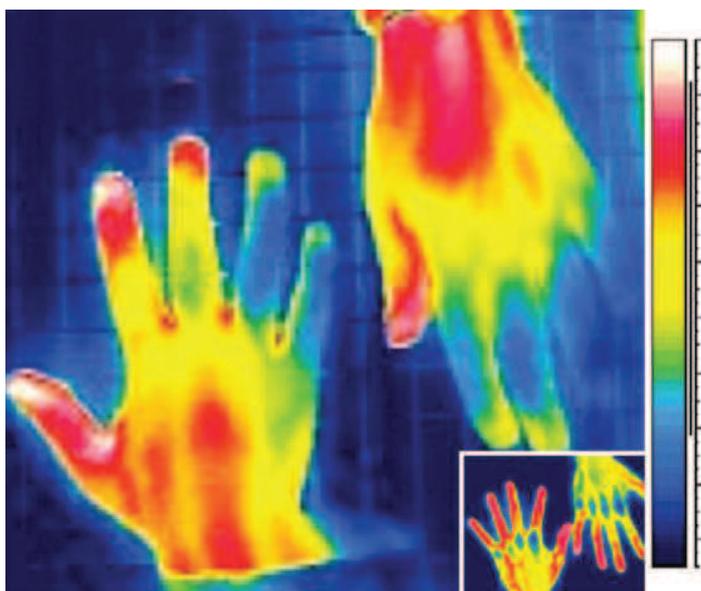


Figure 14 : Thermographie au cours d'une phase syncopale de phénomène de Raynaud

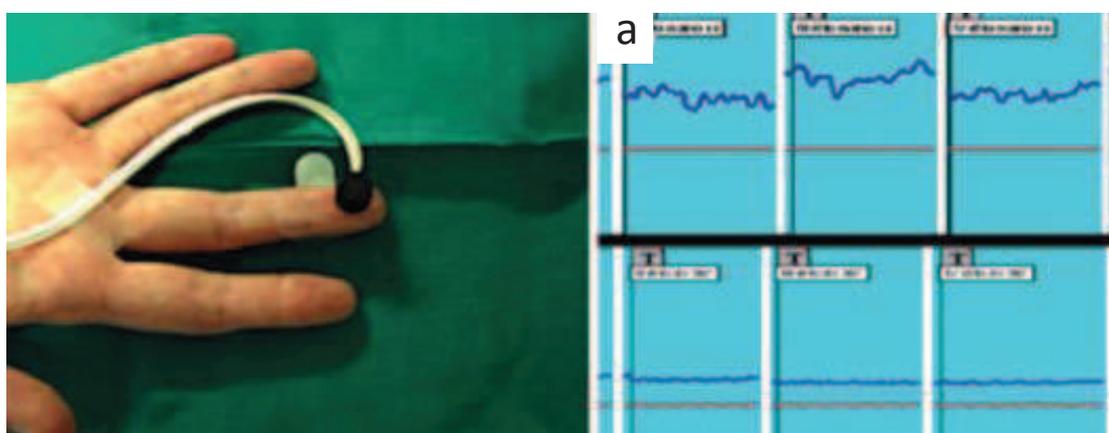


Figure 15 : Laser Doppler : (a) en haut un flux capillaire normal, en bas absence de flux capillaire détectable

2 : Matériels et méthodes

2.1 Population

Les patients ont été inclus de manière prospective et consécutive pendant une période 3 mois de février à avril 2014. Tous les patients remplissaient les critères de sclérodémie selon la classification de LEROY ⁸⁰.

Les témoins étaient des volontaires sains qui travaillaient dans le service de médecine interne.

2.2 Explorations microcirculatoires

2.2.1 Microcirculation sublinguale

La méthode d'acquisition suivait les recommandations d'un groupe d'expert parue en

2007¹¹. L'enregistrement se déroulait chez des sujets au repos, en position assise. D'abord l'examineur appliquait une compresse sous la langue afin de retirer la salive, puis il appliquait la lancette du microscan® sous la langue et effectuait une mise au point et une adaptation de luminosité. Afin de réduire les artefacts de pression l'examineur s'assurait que le flux enregistré dans les veinules de gros calibres était homogène et continu.

La circulation dans la cavité buccale étant hétérogène, plusieurs enregistrements de 20 secondes ont été réalisés afin de pouvoir sélectionner au moins 3 vidéos de bonne qualité prises dans des sites différents. Ensuite les vidéos ont été traitées et analysées à l'aide du logiciel AVA3.2 (Microvision médical®) développé pour l'étude de la microcirculation sublinguale.

Premièrement la luminosité et le contraste ont été modifiés pour obtenir une image homogène et une bonne visualisation des capillaires. Ensuite, des séquences de 10 à 20 secondes ont été stabilisées. Pour chacune d'elles, l'examineur a délimité les vaisseaux visibles sur un même plan. Ce logiciel permet de mesurer plusieurs indicateurs de fonction microcirculatoire comme recommandé dans la conférence de consensus.

Le Score de de Backer et la mesure du score TVD (total vascular density) ont été évalués comme indicateurs de densité capillaire. Le PPV (proportion of perfused vessels), le PVD et le MFI (microvascular flow index) ont également été mesurés afin d'apporter des informations sur la perfusion capillaire.

Afin de déterminer la reproductibilité intra observateur 12 vidéos choisies au hasard ont été analysées une seconde fois ce qui a permis le calcul d'un coefficient de corrélation intra-classe.

2.2.2 Microcirculation digitale

L'acquisition des images péri unguéales a été effectuée à l'aide d'un capillaroscope (Mediscope Digital®) à immersion permettant un grossissement x200. Les patients étaient en position assise, les mains reposant sur une surface plane après application d'une huile de contact. Une image a été enregistrée pour chaque doigt à l'exception des pouces comme décrit par l'équipe italienne de Cutulo^{37, 39}. Les images ont été enregistrées à l'aide du logiciel OptiPix Capillaroscopy (Optilia medical®). Puis celles-ci ont été interprétées à l'aide du logiciel de traitement d'image (imageJ). Pour chaque image un score capillaroscopique a été calculé comme décrit précédemment. Ainsi 5 critères étaient évalués de manière semi-quantitative à l'aide d'une pondération allant de 0 à 3 (tableau 7). Ensuite, les patients ont été classés en 3 « patterns » selon la répartition des anomalies.

- ✓ Précoce : densité capillaire normale ; quelques mégacapillaires ; peu d'hémorragies, pas de désorganisation ni de ramification .

- ✓ Actif : densité capillaire diminuée ; nombreux mégacapillaires et microhémorragies ; désorganisation et ramifications faibles.
- ✓ Tardif : densité diminuée ; peu ou pas de mégacapillaires et d'hémorragies ; désorganisation importante et ramifications nombreuses.

	0	1	2	3
densité (nombre de capillaire/mm)	>9	6;9	4;6	<4
méga capillaires (%du nombre total de capillaires)	>66%	33%-66%	<33%	nle
Hémorragies (%du nombre total de capillaires)				
Ramifications (%du nombre total de capillaires)				
Désorganisation (%du nombre total de capillaires)				

Tableau 6: Description du principe d'évaluation semi-quantitative de paramètres morphologiques en capillaroscopie.

3 Résultats :

3.1 Population

Entre février 2014 et mai 2014, 16 patients suivis pour une sclérodermie systémique au sein du service de médecine interne du CHU de ROUEN ont été inclus. Pour la majorité d'entre eux, les explorations ont été réalisées au cours d'une consultation systématique en dehors de tout évènement aigu. La durée moyenne des explorations était de l'ordre de 10 minutes. Un seul patient était hospitalisé pour une complication à type d'ulcère digital évolutif. Pendant cette période, 10 témoins ont été inclus, il s'agissait de personnes travaillant dans le service de médecine interne.

Pour 3 des patients sclérodermiques, les vidéos enregistrées par le microscan® étaient de qualité insuffisante pour évaluer la microcirculation.

Les caractéristiques démographiques des deux groupes de sujets étaient similaires (tableau 8). Aucune différence en termes de facteurs de risque cardiovasculaires n'était notée entre les patients et les témoins. Parmi les patients atteints de sclérodermie, une majorité avait une sclérodermie limitée (87.5%) associée à la présence d'anticorps anti centromères (56.25%). Parmi les atteintes d'organes, l'atteinte de l'œsophage était la plus fréquente (93.5%) puis venait les antécédents d'ulcères digitaux (56.5%). Un seul malade avait un ulcère digital actif. Un inhibiteur calcique était prescrit chez 75% des malades, alors que seulement deux patients (12.5%) recevaient un inhibiteur des récepteurs de l'endothéline de type 1.

	Sclérodémie n =16	Témoins n=10	p
Données Démographiques			
Sex ratio H/F	14/16	5/5	0.07
Age	57.06±16.28	48.4±16.55	0.92
Histoire de la maladie			
durée d'évolution	8.31±8.11		
sclérodémie diffuse	2(12.5%)		
sclérodémie limitée	14(87.5%)		
maladie de Raynaud		2(25%)	
Maladies associées			
connectivites associées	5(31.25%)	0	0.12
HTA	5(31.25%)	1(10%)	0.18
diabète	0	1(11.1%)	0.38
hypercholestérolémie	2(12.5%)	0	0.51
tabac	3(18.75%)	1(10%)	0.83
Autoanticorps			
AAN	16(100%)	0	<0.01
Scl 70	2(12.5%)		
anti centromères	9(56.25%)		
autre auto AC	6(37.5%)		
Atteintes d'organe			
HTAP	1(6.25%)	0	
antécédent d'ulcère digital	9(56.25%)	0	
ulcère digital actif	1(6.25%)	0	
atteinte digestive	15(93.5%)	0	
atteinte œsophagienne	15(93.5%)	0	
atteinte intestin grêle/estomac	1(6.25%)	0	
atteinte rénale	0	0	
atteinte parenchymateuse pulmonaire	1(6.25%)	0	
Traitements			
inhibiteur calcique	12(75%)	0	<0.01
antagoniste des récepteurs de l'endothéline	2(12.5%)		
immunosuppresseurs	0		
iloméline	1(6.25%)		

Tableau 7: Caractéristiques de la population étudiée.

3.2 Résultats des explorations microcirculatoires (tableau 9)

Les données de capillaroscopie ont pu être obtenues chez 13 patients, et chez 6 témoins. Le score de densité capillaire dans le groupe ScS était en moyenne de 2.12 ± 0.73 , un seul patient avait un score de 1 alors que 8 d'entre eux avaient un score compris entre 2 et 3. Le nombre de méga capillaire retrouvé dans cette population était faible puisque 7 patients avaient un score compris entre 0 et 1, trois patients étaient compris entre 1 et 2 et autant entre 2 et 3. Il en était de même avec les hémorragies puisque tous les patients avaient un score inférieur à 1. Une assez faible proportion de capillaires ramifiés était observée puisque 10 patients avaient moins de 33% de capillaires ramifiés soit un score inférieur à 1. Enfin, 8 patients avaient un score de désorganisation capillaire élevé et quatre un score inférieur à 1. Lorsque l'on compare ces données avec celles de la population témoin, une différence significative était retrouvée pour le score de densité et la désorganisation. Les autres anomalies capillaroscopiques ne différaient pas entre les deux groupes.

	Sclérodermie n =16	Témoins n=10	p
Microcirculation sublinguale			
de Backer	10.56±1.35	11.58±0.85	0.04
PVD	15.33±3.18	18.14±2.13	0.02
MFI	2.67±2.28	2.89±0.13	0.02
Capillaroscopie	n=13	n=6	
densité	2.12±0.73	0.79±0.26	<0.01
méga capillaires	0.88±0.92	0.00	0.13
hémorragies	0.25±0.33	0.05±0.01	0.34
ramifications	0.66±0.65	0	0.13
désorganisation	1.81±0.95	0	<0.01

Tableau 8: Résultats de l'analyse capillaroscopique et de la microcirculation sublinguale

3.3 Sous-groupes de sclérodermie

3.3.1 Comparaison forme active versus tardive (tableau 10).

Parmi les patients atteints de sclérodermie, 4 présentaient une forme active à la capillaroscopie, 8 une forme tardive et un seul présentait une forme précoce. Il n'existait pas de différence d'âge, de durée d'évolution, ou de phénotype clinique entre les patients « actifs » et les « tardifs ». En revanche, un score capillaroscopique significativement plus faible était calculé dans les formes tardives par rapport aux formes actives. Les autres critères de microcirculation sublinguale

n'étaient pas significativement différents.

	ACTIVE n=4	TARDIVE n=8	P
Microscan			
de Backer score	9.17±0.81	10.86±1.19	0.02
PVD	12.51±2.12	15.54±2.52	0.06
MFI	2.51±0.43	2.71±0.22	0.3
Capillaroscopie			
Densité	2.13±0.64	2.34±0.57	0.21
Méga capillaires	1.84±0.33	0.5±0.80	<0.01
Hémorragies	0.53±0.45	0.13±0.26	0.05
Ramifications	0.28±0.125	0.9±0.73	0.13
Désorganisation	1.47±1.23	2.11±0.85	0.28

Tableau 9 : Caractéristiques des patients sclérodermiques selon leur profil capillaroscopique

3.3.2 Comparaison des groupes avec ou sans ulcère digital

Les patients avec ou sans antécédent d'ulcère digital ne présentaient pas de différences significatives sur les caractéristiques cliniques ni sur les données de densité capillaire tant au niveau de la microcirculation sublinguale que péri-unguéale. En revanche il existait une altération significative du score de désorganisation à la capillaroscopie.

Près de 90% des patients avec un antécédent d'ulcère digital recevaient un traitement spécifique contre 71.42% pour les patients n'ayant jamais eu d'ulcère digital (p=0.55). Dans le groupe avec antécédent d'ulcère il s'agissait dans 77.8% d'inhibiteurs calciques, dans 22.2% d'inhibiteurs de l'endothéline de type 1 et dans un cas d'agoniste de la prostacycline. Parmi les sujets sans antécédent d'ulcère digital, 5 étaient sous inhibiteurs calciques et aucun ne recevait d'inhibiteurs des récepteurs de l'endothéline.

	Ulcères digitaux + n=9	Ulcères digitaux -n=7	P
Microscan			
de Backer score	10.67±1.45	10.43±1.30	0.74
TVD	17.54±2.14	17.18±2.88	0.77
PVD	15.46±3.10	15.15±3.52	0.85
MFI	2.61±0.29	2.72±0.26	0.47
Capillaroscopie			
Densité	2.41±0.55	1.85±0.72	0.14
Méga capillaires	0.80±0.86	0.97±1.06	0.74
Hémorragies	0.21±0.28	0.29±0.40	0.69
Ramifications	0.70±0.86	0.60±0.31	0.78
Désorganisation	2.41±0.33	1.10±0.97	0.006

Tableau 10: Caractéristiques des patients sclérodermiques en fonction de l'antécédent ulcère digital

3.4 Corrélations entre le score capillaroscopique et la microcirculation sublinguale (figure 15).

La comparaison entre le score capillaroscopique et la microcirculation sublinguale dans le groupe des patients atteints de sclérodémie systémique permet d'objectiver une corrélation positive entre le score de de BACKER et la densité capillaire ($r^2=0.36$; $p=0.03$). De même, une corrélation significative entre la densité capillaire mesurée en capillaroscopie et la MFI ($r^2=0.46$; $p= 0.01$) et entre la densité capillaire et la PVD ($r^2=0.59$, $p=0.023$) a été retrouvée.

Enfin, une corrélation positive entre la désorganisation des capillaires péri unguéaux et la PVD ($r^2=0.36$, $p=0.031$) était présente.

3.5 Corrélation intra observateur.

Le résultat de la corrélation intra-classe est rapporté dans le tableau 11

	Coefficient de corrélation intra-classe	Intervalle de confiance IC95 %
de Backer	0.85	[0,59;095]
MFI	0.87	[0,52;096]
PVD	0.87	[0,64;096]

Tableau 11: Corrélation inter classe

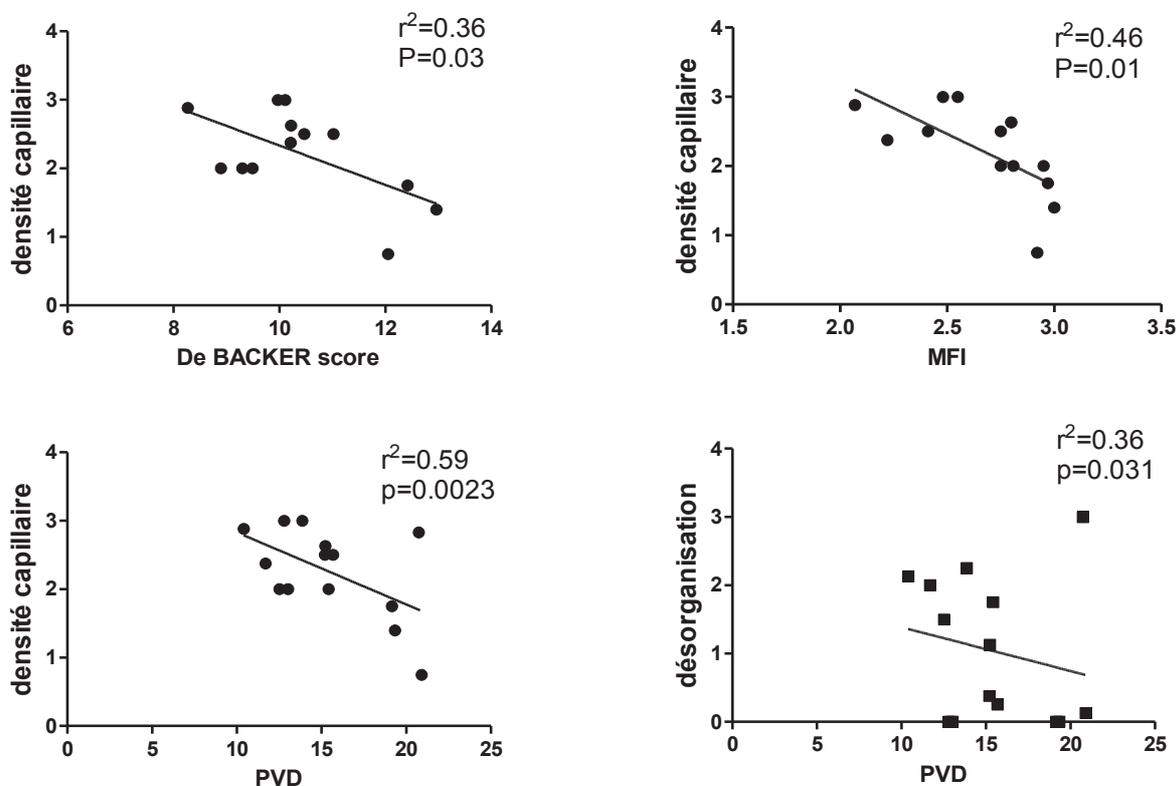


Figure 16 : Corrélations entre le score capillaroscopique et la microcirculation sublinguale

3.5 Mesure de l'épaisseur du glycocalyx par microscan (figure 16)

La mesure du glycocalyx par technique semi-automatique retrouve une épaisseur moyenne de $0.40 \pm 0.21 \mu\text{m}$ dans le groupe ScS contre $0.76 \pm 0.29 \mu\text{m}$ dans le groupe témoin ($p < 0.01$).

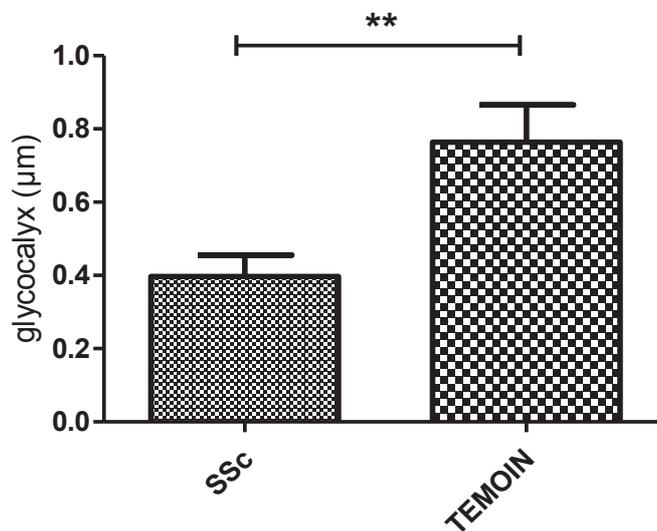


Figure 17 : Epaisseur du glycocalyx évalué par microscan.

4 Discussion :

La sclérodermie est une pathologie caractérisée par une atteinte précoce de la microcirculation. Ce travail a confirmé sur un petit effectif cette altération au niveau unguéal en montrant une diminution de la densité de capillaires perfusés ainsi qu'une plus grande hétérogénéité de la répartition des capillaires dans la population de patients sclérodermiques comparativement à un groupe témoin. Par contre, cette étude préliminaire est la première à décrire les anomalies de la microcirculation sublinguale qui ont été évaluées par une nouvelle technique d'imagerie de la microcirculation. De plus, il a été possible de corrélérer certains paramètres capillaroscopiques à des paramètres d'atteinte sublinguale, confirmant, le continuum physiopathologique de la maladie. Cette donnée va dans le sens des études actuelles qui suggèrent que les altérations retrouvées par la capillaroscopie sont le reflet d'une atteinte diffuse des capillaires de l'organisme

Bien que d'effectif modeste, la population étudiée présentait des caractéristiques clinico-biologiques proches de celles reconnues dans les études de cohorte de plus grande ampleur. En revanche, peu de patients avaient des atteintes d'organes cibles comme l'HTAP ou une pneumopathie interstitielles diffuse ce qui ne nous a pas permis d'étudier la corrélation entre ces atteintes et les altérations microcirculatoires observées.

L'étude des sous-groupes en fonction de la capillaroscopie a montré des résultats inattendus. Tout d'abord il était retrouvé une diminution de la densité de capillaires perfusés au niveau sublinguale plus importante dans les formes actives que dans les formes dites tardives de sclérodermies. De plus, bien qu'attendue, nous n'avons pas retrouvé de différence en terme de densité capillaire à la capillaroscopie entre les patients actifs et les tardifs. L'une des explications est bien évidemment le faible effectif de l'étude puisqu'une tendance vers une densité plus faible de capillaire dans le groupe tardif se dessine. Il est également possible que les patients du groupe tardif aient une forme de sclérodermie peu sévère, ainsi certains patients qui avaient un profil capillaroscopique tardif sur les données de désorganisation, l'absence de mégacapillaire, avaient une densité capillaire presque normale suggérant une néoangiogénèse compensatrice. Ces patients au nombre de 3 avaient un score moyen de densité de 1.72 et une durée d'évolution de la maladie supérieure à 5 ans, deux d'entre eux avaient même une sclérodermie diagnostiquée depuis plus de 15 ans. Cliniquement ces patients avaient une forme limitée et une maladie complètement quiescente cliniquement. Cette notion a déjà été décrite notamment par l'équipe de Sulli qui rapporte la possibilité d'une amélioration du score capillaroscopique lors du suivi. Ainsi dans une population de 90 patients suivis en moyenne 27 mois, 22 patients avaient une amélioration de leur score capillaroscopique, 15 avaient une stabilisation, alors que les 53 autres patients s'aggravaient ¹³⁴.

Par ailleurs, l'analyse du sous-groupe « antécédents d'ulcère digital » n'a pas mis en évidence de différences notables sur les données de la microcirculation sublinguale comparativement au groupe indemne d'ulcère digital. En revanche, une désorganisation plus importante des capillaires péri unguéaux avec une tendance à la diminution de densité capillaire était retrouvée chez les patients ayant un antécédent d'ulcère digital. Ces données sont comparables à celles décrites précédemment dans la littérature ^{3,9,24}. En effet, les altérations capillaroscopiques sont décrites comme plus importantes dans les groupes de patients aux antécédents d'ulcère digital et la présence de zones avasculaires comme prédictive de la survenue de nouveaux ulcères digitaux sur un suivi de 20 mois ³. Dans le même esprit, une équipe a développé un score morphologique CSuRI (Capillaroscopic Skin ulcer Risk Index) basé sur la capillaroscopie afin de prédire la survenue d'un nouvel ulcère digital dans les 3 mois ¹²⁴. Ce score n'a cependant pas été validé de manière prospective.

L'influence des thérapeutiques peut également expliquer les faibles différences entre les groupes. En effet, il a été récemment rapporté que l'utilisation du Bosentan permettait d'améliorer les données de la capillaroscopie ⁴⁰. Cette étude comparait de manière longitudinale sur 3 ans un groupe de 15 malades recevant des cures séquentielles d'iloméline (agoniste de la prostacycline) et un groupe de 15 autres traités par une association d'iloméline et de Bosentan (antagoniste des récepteurs de l'endothéline de type 1). Le groupe qui recevait la bithérapie était constitué à 73% de patients avec un profil capillaroscopique tardif contre 33% dans le groupe traité uniquement par iloméline. Bien que cet essai soit non contrôlé, non randomisé et en ouvert, il suggère un effet bénéfique du bosentan sur la néoangiogenèse en capillaroscopie (augmentation de la densité capillaire et des ramifications).

Les corrélations entre les données de densités capillaires mesurées au niveau sublingual et au niveau péri unguéale sont un des points importants de l'étude qui témoignent encore une fois de la diffusion de l'atteinte vasculaire de la maladie. Ainsi, de nombreuses études ont utilisé les données de la capillaroscopie pour appréhender la diffusion de la maladie à d'autres organes. Ainsi dans une étude menée sur 40 patients atteints de sclérodermie, la densité capillaire était associée à la présence d'une HTAP de manière fortement significative ⁶⁰.

Il est licite de se poser la question de la légitimité de corréler deux techniques à priori différentes explorant un lit capillaire dans deux zones différentes. Néanmoins, ces techniques visualisent la même structure de base qui est le capillaire perfusé. Preuve en est, une étude a retrouvé une quasi similitude entre les deux techniques (capillaroscopie et caméra OPS, version antérieure du SDF) en terme de quantification de la densité capillaire péri unguéale suggérant que les structures analysées étaient identiques ⁹⁵.

Enfin, l'autre résultat majeur de cette étude concerne l'estimation de l'épaisseur du glycocalyx démontrant pour la première fois qu'il existe une altération du glycocalyx au cours de la sclérodémie systémique. Cette donnée nouvelle est cependant cohérente avec le fait que nous retrouvions une altération microcirculatoire. En effet, cette altération est concordante avec les données physiopathologiques de la ScS, puisque les atteintes vasculaires de la maladie atteignent en premier lieu la micro vascularisation et sont à l'origine de multiples épisodes d'ischémie-reperfusion conduisant à une ischémie tissulaire chronique et à un stress oxydant accru. Ces deux conditions (127–129) sont reconnues comme étant à l'origine d'une dysfonction endothéliale^{30,143}. De plus la biodisponibilité du NO est effondrée dans la ScS ce qui contribue à une dérégulation du tonus vasculaire qui se manifeste cliniquement par le phénomène de Raynaud.¹² De manière intéressante, de nombreuses données soutiennent l'hypothèse selon laquelle, le glycocalyx serait à l'origine de la perception du shear stress conduisant à la production de NO^{59,104,116}.

Par ailleurs, le glycocalyx participe à la régulation de la perfusion capillaire, comme l'a montré une étude récente qui retrouvait une corrélation entre la mesure indirecte du glycocalyx au niveau sublinguale et les indices de perfusion locale⁷⁷. De même la dégradation enzymatique du glycocalyx suffit à reproduire des troubles de la perfusion microcirculatoire similaires à ceux observés dans le sepsis²³. De plus, une augmentation des taux circulants d'acide hyaluronique a récemment été rapportée dans la maladie⁸¹. Ces valeurs semblaient prédictives de la gravité de la maladie et notamment de l'atteinte pulmonaire^{47,149}. Ceci suggère que la dégradation du glycocalyx est un facteur promouvant l'installation et la progression des atteintes microcirculatoires de la ScS.

Enfin la mise en évidence d'une altération du glycocalyx malgré l'utilisation quasi systématique d'inhibiteurs calciques dans cette population dont il a déjà été décrit leur effet protecteur (129) nous conforte quand à l'importance de cette atteinte dans la sclérodémie systémique.

Cette étude préliminaire, outre son effectif modeste, a comme autre principal limite le caractère opérateur dépendant des explorations et des analyses qui ont été réalisées par un seul examinateur. Toutefois, les données étaient rendues anonymes et analysées à posteriori ne permettant pas à l'examineur de savoir à quel groupe de patients les images appartenaient. De plus il existait une bonne reproductibilité intra-observateur comme en témoignent les coefficients intra-classes mesurés. Dans un prochain travail il sera indispensable d'effectuer une relecture en aveugle par un 2^{ème} examinateur afin d'évaluer la concordance inter-observateurs.

Nous souhaitons également poursuivre l'étude de la microcirculation sublinguale chez les patients sclérodermiques ayant des atteintes viscérales plus sévère comme l'HTAP. En effet, une étude récente effectuée sur 26 patients suivis pour une HTAP (hors sclérodémie) et 14 contrôles, a rapporté que le score MFI était altéré chez les patients alors qu'ils avaient une densité de capillaires

sublinguale normale ⁴¹. De plus du fait des résultats prometteurs des études qui ont évalué l'effet du bosentan sur les paramètres capillaroscopiques il serait intéressant de coupler ces analyses à l'étude d'un autre site microcirculatoire.

Conclusions

Ces résultats bien que préliminaires, permettent de conforter nos résultats en terme de dysfonction vasculaire dans ces deux pathologies fortement représentées dans notre discipline. Le développement au sein de notre service de ces nouvelles techniques non-invasives et non-irradiantes d'exploration de la microcirculation et d'un déterminant de l'endothélium (le glycocalyx) permet d'entrevoir une nouvelle approche plus fonctionnelle de la gestion de nos patients atteints de pathologies systémiques à fort tropisme vasculaire. De même, des évaluations de l'effet de nos thérapeutiques sur des critères objectifs vont permettre nous l'espérons de rapidement valider certaines attitudes thérapeutiques dont les niveaux de preuve sont faibles.

Enfin, ces méthodes d'exploration, s'inscrivent parfaitement dans la continuité de nos activités de recherche fondamentale dans le domaine de la dysfonction endothéliale des pathologies auto-immunes où l'intrication entre auto-anticorps, paroi vasculaire et thrombose est forte.

REFERENCES

1. Adamson RH, Lenz JF, Zhang X, Adamson GN, Weinbaum S, Curry FE. Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *J. Physiol.* 2004;557(Pt 3):889-907. doi:10.1113/jphysiol.2003.058255.
2. Adiguzel C, Iqbal O, Hoppensteadt D, et al. Comparative anticoagulant and platelet modulatory effects of enoxaparin and sulodexide. *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.* 2009;15(5):501-511. doi:10.1177/1076029609338711.
3. Alivernini S, De Santis M, Toluoso B, et al. Skin ulcers in systemic sclerosis: determinants of presence and predictive factors of healing. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2009;60(3):426-435. doi:10.1016/j.jaad.2008.11.025.
4. Anderson ME, Moore TL, Lunt M, Herrick AL. Digital iontophoresis of vasoactive substances as measured by laser Doppler imaging—a non-invasive technique by which to measure microvascular dysfunction in Raynaud's phenomenon. *Rheumatology* 2004;43(8):986-991. doi:10.1093/rheumatology/keh244.
5. Arad A, Proulle V, Furie RA, Furie BC, Furie B. β_2 -Glycoprotein-1 autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model. *Blood* 2011;117(12):3453-3459. doi:10.1182/blood-2010-08-300715.
6. Arisaka T, Mitsumata M, Kawasumi M, Tohjima T, Hirose S, Yoshida Y. Effects of shear stress on glycosaminoglycan synthesis in vascular endothelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995;748:543-554.
7. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 1999;55(8-9):1078-1087.
8. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2002;11(2):171-178. doi:10.1089/152581602753658385.
9. Avouac J, Vallucci M, Smith V, et al. Correlations between angiogenic factors and capillaroscopic patterns in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* 2013;15(2):R55. doi:10.1186/ar4217.
10. De Backer D, Donadello K, Sakr Y, et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. *Crit. Care Med.* 2013;41(3):791-799. doi:10.1097/CCM.0b013e3182742e8b.
11. De Backer D, Hollenberg S, Boerma C, et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit. Care Lond. Engl.* 2007;11(5):R101. doi:10.1186/cc6118.
12. Baumhakel M, Bohm M. Recent achievements in the management of Raynaud's phenomenon. *Vasc. Health Risk Manag.* 2010;6:207-214.
13. Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc. Res.* 2010;87(2):300-310. doi:10.1093/cvr/cvq137.
14. Van Beers EJ, Goedhart PT, Unger M, Biemond BJ, Ince C. Normal sublingual

- microcirculation during painful crisis in sickle cell disease. *Microvasc. Res.* 2008;76(1):57-60. doi:10.1016/j.mvr.2008.02.001.
15. Van Beers EJ, Nieuwdorp M, Duits AJ, et al. Sickle cell patients are characterized by a reduced glycocalyx volume. *Haematologica* 2008;93(2):307-308. doi:10.3324/haematol.12027.
 16. Bellien J, Iacob M, Remy-Jouet I, et al. Epoxyeicosatrienoic acids contribute with altered nitric oxide and endothelin-1 pathways to conduit artery endothelial dysfunction in essential hypertension. *Circulation* 2012;125(10):1266-1275. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.070680.
 17. Bellien J, Joannides R. Epoxyeicosatrienoic acid pathway in human health and diseases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2013;61(3):188-196. doi:10.1097/FJC.0b013e318273b007.
 18. Benhamou Y, Bellien J, Armengol G, et al. Role of toll-like receptors 2 and 4 in mediating endothelial dysfunction and arterial remodeling in primary arterial antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2014:n/a-n/a. doi:10.1002/art.38785.
 19. Van den Berg BM, Vink H, Spaan JAE. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ. Res.* 2003;92(6):592-594. doi:10.1161/01.RES.0000065917.53950.75.
 20. Boerma EC, Kuiper MA, Kingma WP, Egbers PH, Gerritsen RT, Ince C. Disparity between skin perfusion and sublingual microcirculatory alterations in severe sepsis and septic shock: a prospective observational study. *Intensive Care Med.* 2008;34(7):1294-1298. doi:10.1007/s00134-008-1007-x.
 21. Bourin MC, Lindahl U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem. J.* 1993;289 (Pt 2):313-330.
 22. Broekhuizen LN, Lemkes BA, Mooij HL, et al. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2010;53(12):2646-2655. doi:10.1007/s00125-010-1910-x.
 23. Cabrales P, Vázquez BYS, Tsai AG, Intaglietta M. Microvascular and capillary perfusion following glycocalyx degradation. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* 2007;102(6):2251-2259. doi:10.1152/japplphysiol.01155.2006.
 24. Caramaschi P, Canestrini S, Martinelli N, et al. Scleroderma patients nailfold videocapillaroscopic patterns are associated with disease subset and disease severity. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 2007;46(10):1566-1569. doi:10.1093/rheumatology/kem190.
 25. Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. *Nature* 1969;223(5211):1159-1160.
 26. Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J. Clin. Invest.* 1996;97(1):111-119. doi:10.1172/JCI118377.
 27. Chajara A, Levesque H, Courel MN, et al. Hyaluronan and hyaluronectin production in injured rat thoracic aorta. *Atherosclerosis* 1996;125(2):193-207.

28. Chajara A, Raoudi M, Delpech B, Leroy M, Basuyau JP, Levesque H. Increased hyaluronan and hyaluronidase production and hyaluronan degradation in injured aorta of insulin-resistant rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20(6):1480-1487.
29. Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, et al. TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res. Cardiol.* 2009;104(1):78-89. doi:10.1007/s00395-008-0749-5.
30. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, et al. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 2009;83(2):388-396. doi:10.1093/cvr/cvp097.
31. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, et al. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology* 2007;107(5):776-784.
32. Charakida M, Besler C, Batuca JR, et al. Vascular abnormalities, paraoxonase activity, and dysfunctional HDL in primary antiphospholipid syndrome. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2009;302(11):1210-1217. doi:10.1001/jama.2009.1346.
33. Coccheri S, Scondotto G, Agnelli G, Palazzini E, Zamboni V, Arterial Arm of the Suavis (Sulodexide Arterial Venous Italian Study) group. Sulodexide in the treatment of intermittent claudication. Results of a randomized, double-blind, multicentre, placebo-controlled study. *Eur. Heart J.* 2002;23(13):1057-1065.
34. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20(9):2032-2037.
35. Cornette J, Herzog E, Buijs E a. B, et al. Microcirculation in women with severe pre-eclampsia and HELLP syndrome: a case-control study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 2014;121(3):363-370. doi:10.1111/1471-0528.12475.
36. Cosentino F, Lüscher TF. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc. Res.* 1999;43(2):274-278.
37. Cutolo M, Pizzorni C, Tuccio M, et al. Nailfold videocapillaroscopic patterns and serum autoantibodies in systemic sclerosis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 2004;43(6):719-726. doi:10.1093/rheumatology/keh156.
38. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Accardo S. Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2000;27(1):155-160.
39. Cutolo M, Sulli A, Smith V. How to perform and interpret capillaroscopy. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2013;27(2):237-248. doi:10.1016/j.berh.2013.03.001.
40. Cutolo M, Zampogna G, Vremis L, Smith V, Pizzorni C, Sulli A. Longterm effects of endothelin receptor antagonism on microvascular damage evaluated by nailfold capillaroscopic analysis in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2013;40(1):40-45. doi:10.3899/jrheum.120416.
41. Dababneh L, Cikach F, Alkukhun L, Dweik RA, Tonelli AR. Sublingual Microcirculation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2014. doi:10.1513/AnnalsATS.201308-277OC.
42. Endo K, Takino T, Miyamori H, et al. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix

metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J. Biol. Chem.* 2003;278(42):40764-40770. doi:10.1074/jbc.M306736200.

43. Erkan D, Yazici Y, Peterson MG, Sammaritano L, Lockshin MD. A cross-sectional study of clinical thrombotic risk factors and preventive treatments in antiphospholipid syndrome. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 2002;41(8):924-929.
44. Erol-Yilmaz A, Atasever B, Mathura K, et al. Cardiac resynchronization improves microcirculation. *J. Card. Fail.* 2007;13(2):95-99. doi:10.1016/j.cardfail.2006.10.016.
45. Farouk HM, Hamza SH, El Bakry SA, et al. Dysregulation of angiogenic homeostasis in systemic sclerosis. *Int. J. Rheum. Dis.* 2013;16(4):448-454. doi:10.1111/1756-185X.12130.
46. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.* 2003;35(3):236-256.
47. Freitas JP, Filipe P, Emerit I, Meunier P, Manso CF, Guerra Rodrigo F. Hyaluronic acid in progressive systemic sclerosis. *Dermatol. Basel Switz.* 1996;192(1):46-49.
48. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288(5789):373-376.
49. Gambaro G, Kinalska I, Oksa A, et al. Oral sulodexide reduces albuminuria in microalbuminuric and macroalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients: the Di.N.A.S. randomized trial. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 2002;13(6):1615-1625.
50. Gandhi NS, Mancera RL. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* 2008;72(6):455-482. doi:10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x.
51. García de la Peña-Lefebvre P, Chanseaud Y, Tamby MC, et al. IgG reactivity with a 100-kDa tissue and endothelial cell antigen identified as topoisomerase 1 distinguishes between limited and diffuse systemic sclerosis patients. *Clin. Immunol.* 2004;111(3):241-251. doi:10.1016/j.clim.2004.01.005.
52. Girón-González JA, García del Río E, Rodríguez C, Rodríguez-Martorell J, Serrano A. Antiphospholipid syndrome and asymptomatic carriers of antiphospholipid antibody: prospective analysis of 404 individuals. *J. Rheumatol.* 2004;31(8):1560-1567.
53. Goedhart PT, Khalilzada M, Bezemer R, Merza J, Ince C. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Opt. Express* 2007;15(23):15101-15114. doi:10.1364/OE.15.015101.
54. Van Golen RF, Reiniers MJ, Vrisekoop N, et al. The Mechanisms and Physiological Relevance of Glycocalyx Degradation in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Antioxid. Redox Signal.* 2014. doi:10.1089/ars.2013.5751.
55. Gouverneur M, Berg B, Nieuwdorp M, Stroes E, Vink H. Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress. *J. Intern. Med.* 2006;259(4):393-400. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01625.x.
56. Gronski TJ Jr, Martin RL, Kobayashi DK, et al. Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J. Biol. Chem.* 1997;272(18):12189-12194.

57. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320(6061):454-456. doi:10.1038/320454a0.
58. Van Haaren PMA, VanBavel E, Vink H, Spaan JAE. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;285(6):H2848-2856. doi:10.1152/ajpheart.00117.2003.
59. Hecker M, Mulsch A, Bassenge E, Busse R. Vasoconstriction and increased flow: two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacoid release. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 1993;265(3):H828-H833.
60. Hofstee HMA, Vonk Noordegraaf A, Voskuyl AE, et al. Nailfold capillary density is associated with the presence and severity of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2009;68(2):191-195. doi:10.1136/ard.2007.087353.
61. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res. Ther.* 2003;5(2):80-93.
62. Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2013;65(11):2737-2747. doi:10.1002/art.38098.
63. Ignarro LJ. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 1990;16(5):477-483.
64. Ihn H, Sato S, Fujimoto M, et al. Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): association with pulmonary fibrosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2000;119(1):203-209. doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01115.x.
65. Iozzo RV, San Antonio JD. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J. Clin. Invest.* 2001;108(3):349-355. doi:10.1172/JCI13738.
66. Jacob M, Rehm M, Loetsch M, et al. The Endothelial Glycocalyx Prefers Albumin for Evoking Shear Stress-Induced, Nitric Oxide-Mediated Coronary Dilatation. *J. Vasc. Res.* 2007;44(6):435-443. doi:10.1159/000104871.
67. Joglekar A, Tsai FS, McCloskey DA, Wilson JE, Seibold JR, Riley DJ. Bosentan in pulmonary arterial hypertension secondary to scleroderma. *J. Rheumatol.* 2006;33(1):61-68.
68. Johnson Z, Proudfoot AE, Handel TM. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(6):625-636. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.04.006.
69. Kahaleh MB. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum.* 1991;34(8):978-983.
70. Kahaleh MB, Osborn I, LeRoy EC. Increased factor VIII/von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor activity in scleroderma and in Raynaud's phenomenon. *Ann. Intern. Med.* 1981;94(4 pt 1):482-484.
71. Kaplanski G, Cacoub P, Farnarier C, et al. Increased soluble vascular cell adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus-related

- antiphospholipid syndrome: correlations with the severity of thrombosis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):55-64. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<55::AID-ANR8>3.0.CO;2-M.
72. Khalilzada M, Dogan K, Ince C, Stam J. Sublingual microvascular changes in patients with cerebral small vessel disease. *Stroke J. Cereb. Circ.* 2011;42(7):2071-2073. doi:10.1161/STROKEAHA.110.611574.
 73. Kinev AV, Roubey RAS. Tissue factor in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008;17(10):952-958. doi:10.1177/0961203308096662.
 74. Kliment CR, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase protects cardiovascular syndecan-1 from oxidative shedding. *Free Radic. Biol. Med.* 2011;50(9):1075-1080. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.014.
 75. Kloner RA, Giacomelli F, Alker KJ, Hale SL, Matthews R, Bellows S. Influx of neutrophils into the walls of large epicardial coronary arteries in response to ischemia/reperfusion. *Circulation* 1991;84(4):1758-1772.
 76. Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(12):3902-3912. doi:10.1002/art.24038.
 77. Lee DH, Dane MJC, van den Berg BM, et al. Deeper penetration of erythrocytes into the endothelial glycocalyx is associated with impaired microvascular perfusion. *PloS One* 2014;9(5):e96477. doi:10.1371/journal.pone.0096477.
 78. Le JH, Cho KI. Association between endothelial function and microvascular changes in patients with secondary Raynaud's phenomenon. *Clin. Rheumatol.* 2014. doi:10.1007/s10067-014-2553-y.
 79. Lennon FE, Singleton PA. Hyaluronan regulation of vascular integrity. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 2011;1(3):200-213.
 80. LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2001;28(7):1573-1576.
 81. Levesque H, Baudot N, Delpech B, et al. Clinical correlations and prognosis based on hyaluronic acid serum levels in patients with progressive systemic sclerosis. *Br. J. Dermatol.* 1991;124(5):423-428.
 82. Lipowsky HH. The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases. *Ann. Biomed. Eng.* 2012;40(4):840-848. doi:10.1007/s10439-011-0427-x.
 83. Lipowsky HH, Lescanic A. The effect of doxycycline on shedding of the glycocalyx due to reactive oxygen species. *Microvasc. Res.* 2013;90:80-85. doi:10.1016/j.mvr.2013.07.004.
 84. Liuhanen S, Sallisalmi M, Pettilä V, Oksala N, Tenhunen J. Indirect measurement of the vascular endothelial glycocalyx layer thickness in human submucosal capillaries with a plug-in for ImageJ. *Comput. Methods Programs Biomed.* 2013;110(1):38-47. doi:10.1016/j.cmpb.2012.10.019.
 85. López-Pedrerá C, Buendía P, Cuadrado MJ, et al. Antiphospholipid antibodies from patients

with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum.* 2006;54(1):301-311. doi:10.1002/art.21549.

86. Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000;102(19):2434-2440.
87. Maddison L, Karjagin J, Buldakov M, et al. Sublingual microcirculation in patients with intra-abdominal hypertension: A pilot study in 15 critically ill patients. *J. Crit. Care* 2014;29(1):183.e1-183.e6. doi:10.1016/j.jcrc.2013.08.018.
88. Mambetsariev N, Mirzapoiiazova T, Mambetsariev B, et al. Hyaluronic Acid binding protein 2 is a novel regulator of vascular integrity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010;30(3):483-490. doi:10.1161/ATVBAHA.109.200451.
89. Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 2010;14(6a):1241-1254. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01027.x.
90. Manetti M, Guiducci S, Romano E, et al. Increased plasma levels of the VEGF165b splice variant are associated with the severity of nailfold capillary loss in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2013;72(8):1425-1427. doi:10.1136/annrheumdis-2012-203183.
91. Manetti M, Guiducci S, Romano E, et al. Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ. Res.* 2011;109(3):e14-26. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.242057.
92. Mannello F, Medda V, Ligi D, Raffetto JD. Glycosaminoglycan sulodexide inhibition of MMP-9 gelatinase secretion and activity: possible pharmacological role against collagen degradation in vascular chronic diseases. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2013;11(3):354-365.
93. Martens RJH, Vink H, van Oostenbrugge RJ, Staals J. Sublingual microvascular glycocalyx dimensions in lacunar stroke patients. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 2013;35(5):451-454. doi:10.1159/000348854.
94. Massberg S, Enders G, Leiderer R, et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998;92(2):507-515.
95. Mathura KR, Vollebregt KC, Boer K, De Graaff JC, Ubbink DT, Ince C. Comparison of OPS imaging and conventional capillary microscopy to study the human microcirculation. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* 2001;91(1):74-78.
96. Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: evidence that systemic sclerosis is a vascular disease. *Arthritis Rheum.* 2013;65(8):1953-1962. doi:10.1002/art.37988.
97. McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am. J. Physiol.* 1994;267(5 Pt 2):H1921-1927.
98. Megens RTA, Reitsma S, Schiffers PHM, et al. Two-photon microscopy of vital murine

elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution. *J. Vasc. Res.* 2007;44(2):87-98. doi:10.1159/000098259.

99. Mercanoglu F, Erdogan D, Oflaz H, et al. Impaired brachial endothelial function in patients with primary anti-phospholipid syndrome. *Int. J. Clin. Pract.* 2004;58(11):1003-1007.
100. Mihai C, Tervaert JWC. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2010;69(2):319-324. doi:10.1136/ard.2008.102400.
101. Milstein DMJ, te Boome LCJ, Cheung YW, et al. Use of sidestream dark-field (SDF) imaging for assessing the effects of high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation on oral mucosal microcirculation in myeloma patients. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2010;109(1):91-97. doi:10.1016/j.tripleo.2009.08.041.
102. Miranda S, Benhamou Y, Armengol G, et al. Infliximab improves endothelial dysfunction in a mouse model of Antiphospholipid syndrome: Role of reduced oxidative stress.
103. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost. JTH* 2006;4(2):295-306. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x.
104. Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;285(2):H722-726. doi:10.1152/ajpheart.00691.2002.
105. Moseley R, Waddington RJ, Embery G. Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1997;1362(2-3):221-231. doi:10.1016/S0925-4439(97)00083-5.
106. Murray AK, Moore TL, Manning JB, Taylor C, Griffiths CEM, Herrick AL. Noninvasive imaging techniques in the assessment of scleroderma spectrum disorders. *Arthritis Rheum.* 2009;61(8):1103-1111. doi:10.1002/art.24645.
107. Nadaud S, Philippe M, Arnal JF, Michel JB, Soubrier F. Sustained increase in aortic endothelial nitric oxide synthase expression in vivo in a model of chronic high blood flow. *Circ. Res.* 1996;79(4):857-863.
108. Nevskaya T, Bykovskaia S, Lyssuk E, et al. Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: relation to impaired angiogenesis and cardiovascular manifestations. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2008;26(3):421-429.
109. Nieuwdorp M, van Haeften TW, Gouverneur MCLG, et al. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes* 2006;55(2):480-486.
110. Nieuwdorp M, Holleman F, Groot E de, et al. Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis. *Diabetologia* 2007;50(6):1288-1293. doi:10.1007/s00125-007-0666-4.
111. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL, et al. Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* 2008;104(3):845-852. doi:10.1152/japplphysiol.00440.2007.
112. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibition

- protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation. *Atherosclerosis* 2009;202(1):296-303. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.03.024.
113. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, et al. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 2006;55(4):1127-1132.
 114. Ohdama S, Takano S, Miyake S, Kubota T, Sato K, Aoki N. Plasma thrombomodulin as a marker of vascular injuries in collagen vascular diseases. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994;101(1):109-113.
 115. Padberg J-S, Wiesinger A, di Marco GS, et al. Damage of the endothelial glycocalyx in chronic kidney disease. *Atherosclerosis* 2014;234(2):335-343. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.016.
 116. Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO, Tarbell JM. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;355(1):228-233. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.137.
 117. Pedrinelli R. Endothelial vasomotor dysfunction in hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 2000;14(8):481-483.
 118. Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation* 1999;99(15):1997-2002.
 119. Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Harris EN. Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin. *Circ. Res.* 2001;88(2):245-250.
 120. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 2000;440(5):653-666.
 121. Puré E, Assoian RK. Rheostatic signaling by CD44 and hyaluronan. *Cell. Signal.* 2009;21(5):651-655. doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.024.
 122. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 2007;454(3):345-359. doi:10.1007/s00424-007-0212-8.
 123. Rössig L, Dimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res. Cardiol.* 2001;96(1):11-22.
 124. Sebastiani M, Manfredi A, Colaci M, et al. Capillaroscopic skin ulcer risk index: a new prognostic tool for digital skin ulcer development in systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* 2009;61(5):688-694. doi:10.1002/art.24394.
 125. Servettaz A, Tamby MC, Guilpain P, et al. Anti-endothelial cell antibodies from patients with limited cutaneous systemic sclerosis bind to centromeric protein B (CENP-B). *Clin. Immunol.* 2006;120(2):212-219. doi:10.1016/j.clim.2006.02.006.
 126. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J. Clin. Invest.* 1996;98(3):785-792. doi:10.1172/JCI118851.

127. Da Silva FF, Levy RA, de Carvalho JF. Cardiovascular Risk Factors in the Antiphospholipid Syndrome. *J. Immunol. Res.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/621270.
128. Singleton PA, Dudek SM, Ma S-F, Garcia JGN. Transactivation of sphingosine 1-phosphate receptors is essential for vascular barrier regulation. Novel role for hyaluronan and CD44 receptor family. *J. Biol. Chem.* 2006;281(45):34381-34393. doi:10.1074/jbc.M603680200.
129. Singleton PA, Mirzapoiazova T, Guo Y, et al. High-molecular-weight hyaluronan is a novel inhibitor of pulmonary vascular leakiness. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2010;299(5):L639-651. doi:10.1152/ajplung.00405.2009.
130. Singleton PA, Salgia R, Moreno-Vinasco L, et al. CD44 regulates hepatocyte growth factor-mediated vascular integrity. Role of c-Met, Tiam1/Rac1, dynamin 2, and cortactin. *J. Biol. Chem.* 2007;282(42):30643-30657. doi:10.1074/jbc.M702573200.
131. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346(6283):425-434. doi:10.1038/346425a0.
132. Sulli A, Pizzorni C, Smith V, Zampogna G, Ravera F, Cutolo M. Timing of transition between capillaroscopic patterns in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(3):821-825. doi:10.1002/art.33463.
133. Sulli A, Ruaro B, Alessandri E, et al. Correlations between nailfold microangiopathy severity, finger dermal thickness and fingertip blood perfusion in systemic sclerosis patients. *Ann. Rheum. Dis.* 2014;73(1):247-251. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202572.
134. Sulli A, Secchi ME, Pizzorni C, Cutolo M. Scoring the nailfold microvascular changes during the capillaroscopic analysis in systemic sclerosis patients. *Ann. Rheum. Dis.* 2008;67(6):885-887. doi:10.1136/ard.2007.079756.
135. Sulli A, Soldano S, Pizzorni C, et al. Raynaud's phenomenon and plasma endothelin: correlations with capillaroscopic patterns in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2009;36(6):1235-1239. doi:10.3899/jrheum.081030.
136. Tan L, Kowalska MA, Romo GM, Lopez JA, Darzynkiewicz Z, Niewiarowski S. Identification and characterization of endothelial glycoprotein Ib using viper venom proteins modulating cell adhesion. *Blood* 1999;93(8):2605-2616.
137. Tarbell JM, Pahakis MY. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J. Intern. Med.* 2006;259(4):339-350. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01620.x.
138. Tingey T, Shu J, Smuczek J, Pope J. Meta-analysis of healing and prevention of digital ulcers in systemic sclerosis. *Arthritis Care Res.* 2013;65(9):1460-1471. doi:10.1002/acr.22018.
139. Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Lesèche G, Tedgui A. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2000;101(21):2450-2453.
140. Vaarala O. Antiphospholipid antibodies and myocardial infarction. *Lupus* 1998;7 Suppl 2:S132-134.
141. Verdant CL, De Backer D, Bruhn A, et al. Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis. *Crit. Care Med.* 2009;37(11):2875-2881. doi:10.1097/CCM.0b013e3181b029c1.

142. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JA. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 2000;101(13):1500-1502.
143. Vink H, Duling BR. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000;278(1):H285-289.
144. Vink H, Duling BR. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ. Res.* 1996;79(3):581-589.
145. Voyvodic PL, Min D, Liu R, et al. Loss of Syndecan-1 Induces a Pro-inflammatory Phenotype in Endothelial Cells with a Dysregulated Response to Atheroprotective Flow. *J. Biol. Chem.* 2014;289(14):9547-9559. doi:10.1074/jbc.M113.541573.
146. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2007;9:121-167. doi:10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959.
147. Worda M, Sgonc R, Dietrich H, et al. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. *Arthritis Rheum.* 2003;48(9):2605-2614. doi:10.1002/art.11179.
148. Yoshio T, Masuyama J, Mimori A, Takeda A, Minota S, Kano S. Endothelin-1 release from cultured endothelial cells induced by sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 1995;54(5):361-365. doi:10.1136/ard.54.5.361.
149. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, et al. Clinical significance of serum hyaluronan levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *J. Rheumatol.* 2008;35(9):1825-1829.
150. Zeng Y, Adamson RH, Curry F-RE, Tarbell JM. Sphingosine-1-phosphate protects endothelial glycocalyx by inhibiting syndecan-1 shedding. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2014;306(3):H363-372. doi:10.1152/ajpheart.00687.2013.
151. Zhu S, Evans S, Yan B, et al. Transcriptional regulation of Bim by FOXO3a and Akt mediates scleroderma serum-induced apoptosis in endothelial progenitor cells. *Circulation* 2008;118(21):2156-2165. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.787200.

