



# Etude de l'impact des polynucléaires neutrophiles et de deux enzymes dérivées, cathepsine G et élastase sur la coagulation

Julien Perrin

## ► To cite this version:

Julien Perrin. Etude de l'impact des polynucléaires neutrophiles et de deux enzymes dérivées, cathepsine G et élastase sur la coagulation. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10107 . tel-01748317

**HAL Id: tel-01748317**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748317>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

**Ecole Doctorale ‘ Biologie – Santé – Environnement ’**

*Mention : Ingénierie Cellulaire et Tissulaire*

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement

Le 03 Novembre 2009

Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L’UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1**

Par

**Julien PERRIN**

**ETUDE DE L’IMPACT DES POLYNUCLEAIRES  
NEUTROPHILES ET DE DEUX ENZYMES DERIVEES,  
CATHEPSINE G ET ELASTASE  
SUR LA COAGULATION**

**Membres du Jury**

***Rapporteurs***

**Pr Philippe NGUYEN**

**(EA3801, Université de Reims, France)**

**Pr Benoît POLACK**

**(UMR 5525, Université Joseph Fourier – Grenoble, France)**

***Examineurs***

**Pr Martine AIACH**

**(Inserm U765, Université Paris Descartes, France)**

**Pr Pierre FEUGIER**

**(UHP – Nancy 1, France)**

**Pr Thomas LECOMPTE**

**(Inserm U961, UHP – Nancy 1, France)**

***Directeur de Thèse***

**Pr Claude VIGNERON**

**(EA3452, UHP – Nancy 1, France)**

***Membre invité***

**Dr Monique MARCHAND-ARVIER (Les Contamines – Montjoie, France)**

**Laboratoire de rattachement :**

**EA3452 ‘Cibles thérapeutiques, formulation et expertise préclinique du médicament’ Pr Philippe MAINCENT  
UNIVERSITE HENRI POINCARE – Faculté de Pharmacie**

*A ma petite famille,  
Sophie,  
Et Laura,  
mon petit chef d'œuvre, dont le sourire m'a permis  
de venir à bout de cette montagne*

*A ma Maman chérie*

*A mon Papa*

*A mes grand-parents*

*A la famille Phan Dinh*

*A tous mes amis*

*A mon Directeur de Thèse,*

*Mr le Pr Claude Vigneron*

*A qui je dois d'être « arrivé jusque là », qui m'a orienté et conseillé depuis le début de mes études. Soyez assuré de ma profonde gratitude, de toute mon estime et de mon plus grand respect.*

*A mes Juges,*

*Mme le Pr Martine Aiach, qui m'a fait le grand honneur de juger ce travail. Soyez assurée de mon profond respect.*

*Mr le Pr Pierre Feugier, qui m'a aidé dans la conception de l'étude clinique et dont j'ai pu apprécier les compétences et la disponibilité. Vous avez accepté de juger ce travail. Soyez assuré de tout mon respect.*

*Mr le Pr Thomas Lecompte, dont la contribution à ce travail est conséquente et qui m'a toujours permis de pousser plus loin encore mes réflexions. Votre accompagnement et votre soutien m'ont beaucoup aidé et je tiens également à vous remercier du temps qui a pu m'être accordé pour produire ce travail. Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de tout mon respect.*

*A mes Rapporteurs,*

*Mr le Pr Philippe NGuyen,*

*Mr le Pr Benoît Polack,*

*Vous avez accepté d'examiner ce travail. Soyez assurés de notre grande reconnaissance et de toute notre considération.*

*A Mme le Dr Monique Marchand-Arvier,*

*Avec qui ce travail a été initié et qui m'a fait l'honneur de quitter un temps le « grand air » pour participer à ce jury. Soyez assurée de toute ma gratitude.*

*Je tiens à remercier tout le personnel du Service d'Hématologie Biologique du CHU de Nancy, techniciens, secrétaires et biologistes, les secteurs cytologie, d'hémostase et cytométrie du flux, pour les analyses toujours réalisées dans la bonne humeur, mais surtout le secteur d'exploration fonctionnelle cellulaire, Yveline, Martine, Fred et Denis pour leur aide, précieux conseils et compétence en hémostase, ainsi que Viviane, sans qui ce travail ne serait pas grand-chose.*

*Lise Morlon, Agnès Tournier, Géraldine Girard et Mme le Dr Fabienne Empereur pour leur contribution active à ce travail.*

*Mme le Dr Dana Ranta, pour son dynamisme, sa compétence et avec qui j'ai toujours grand plaisir à échanger quelques mots.*

*Mme le Dr Marie Toussaint-Hacquard, pour sa contribution indirecte mais immense à ce travail.*

*Merci à Mr le Pr Philippe Maincent et tous les membres de l'EA3452 et en particulier, Géraldine, Isabelle, Valérie et Paulo.*

*Et une pensée profonde pour Mme le Dr Nathalie Ubrich.*

*Je tiens également à remercier le Dr Thierry Schneider, Directeur de l'EFS-LC, ainsi que le Dr Chantal Jacquot, Evelyne et Marie-Jeanne pour leur aide à la constitution de population témoin.*

*Un grand Merci également à tous les donneurs bénévoles et volontaires (parfois quand même avec une promesse de récompense de quelques Schokobons®), ainsi que tout le personnel les ayant prélevés.*



# TABLE DES MATIERES

|                                                                                                                          |               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Index des figures</b>                                                                                                 | <b>- 5 -</b>  |
| <b>Index des tableaux</b>                                                                                                | <b>- 7 -</b>  |
| <b>Liste des publications</b>                                                                                            | <b>- 8 -</b>  |
| <b>Abréviations</b>                                                                                                      | <b>- 10 -</b> |
| <b>PREAMBULE</b>                                                                                                         | <b>- 12 -</b> |
| <b>A. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>                                                                                        | <b>- 19 -</b> |
| <i>A.I. Rappels sur les polynucléaires neutrophiles</i>                                                                  | - 20 -        |
| A.I.1- Origine et maturation                                                                                             | - 20 -        |
| A.I.2- Morphologie                                                                                                       | - 21 -        |
| A.I.3- Physiologie                                                                                                       | - 23 -        |
| A.I.3.1 Adhérence aux cellules endothéliales et passage dans les tissus par diapédèse                                    | - 23 -        |
| A.I.3.2 Chimiotactisme et déplacement                                                                                    | - 24 -        |
| A.I.3.3 Adhérence aux agents pathogènes et phagocytose                                                                   | - 25 -        |
| A.I.3.4 Activités « tueuses » et sécrétoires                                                                             | - 26 -        |
| A.I.4- « Etats transitoires » du polynucléaire                                                                           | - 28 -        |
| Références                                                                                                               | - 29 -        |
| <i>A.II. Cathepsine G et élastase : physiologie</i>                                                                      | - 31 -        |
| A.II.1- Gènes, transcription et lieu de stockage intracellulaire                                                         | - 31 -        |
| A.II.2- Localisation extracellulaire                                                                                     | - 32 -        |
| A.II.3- Activités enzymatiques et fonctions biologiques                                                                  | - 34 -        |
| A.II.3.1 Activité antibiotique ou microbicide                                                                            | - 34 -        |
| A.II.3.2 Activité protéasique                                                                                            | - 34 -        |
| Références                                                                                                               | - 37 -        |
| <i>A.III. Hémostase et coagulation</i>                                                                                   | - 38 -        |
| A.III.1- Déroulement de la coagulation                                                                                   | - 38 -        |
| A.III.1.1 Initiation                                                                                                     | - 38 -        |
| A.III.1.2 Amplification                                                                                                  | - 39 -        |
| A.III.1.3 Propagation                                                                                                    | - 39 -        |
| A.III.2- Régulation de la coagulation                                                                                    | - 41 -        |
| A.III.2.1 Antithrombine (AT)                                                                                             | - 41 -        |
| A.III.2.2 Système de la protéine C / protéine S / thrombomoduline                                                        | - 42 -        |
| A.III.2.3 TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor)                                                                         | - 42 -        |
| A.III.2.4 Autres inhibiteurs de la coagulation                                                                           | - 42 -        |
| A.III.2.41 L'α2-macroglobuline (α2M)                                                                                     | - 42 -        |
| A.III.2.42 Le second cofacteur de l'héparine (HCII)                                                                      | - 43 -        |
| A.III.2.43 L'α1-antitrypsine                                                                                             | - 43 -        |
| Références                                                                                                               | - 44 -        |
| <i>A.IV. Polynucléaires neutrophiles et coagulation</i>                                                                  | - 45 -        |
| A.IV.1- Facteur tissulaire et polynucléaires neutrophiles                                                                | - 45 -        |
| Références                                                                                                               | - 50 -        |
| A.IV.2- Les polynucléaires neutrophiles : support membranaire de la coagulation et/ou surface propice à la coagulation ? | - 52 -        |
| Références                                                                                                               | - 58 -        |
| A.IV.3- Espèces réactives oxygénées dérivées des polynucléaires et hémostase                                             | - 62 -        |
| Références                                                                                                               | - 65 -        |
| A.IV.4- Cathepsine G, élastase et Hémostase                                                                              | - 66 -        |



|                                                                                                     |                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| A.IV.4.1 Impact sur la fibrinolyse                                                                  | - 66 -         |
| A.IV.4.2 Impact sur la coagulation                                                                  | - 66 -         |
| A.IV.4.21 Prothrombine, thrombine et fibrinogène                                                    | - 67 -         |
| A.IV.4.22 Tenase extrinsèque                                                                        | - 68 -         |
| A.IV.4.23 Prothrombinase                                                                            | - 68 -         |
| A.IV.4.24 Tenase intrinsèque                                                                        | - 69 -         |
| A.IV.4.25 Systèmes inhibiteurs                                                                      | - 70 -         |
| A.IV.4.26 Autres protéines de la coagulation                                                        | - 72 -         |
| A.IV.4.3 Impact sur les plaquettes                                                                  | - 75 -         |
| Références                                                                                          | - 79 -         |
| A.IV.5- Impact en pathologie humaine                                                                | - 85 -         |
| Références                                                                                          | - 89 -         |
| A.IV.6- Syndromes myéloprolifératifs, leucocytose et risque vasculaire                              | - 91 -         |
| Références                                                                                          | - 96 -         |
| <b>B. OBJECTIFS</b>                                                                                 | <b>- 99 -</b>  |
| <b>C. TRAVAIL EXPERIMENTAL</b>                                                                      | <b>- 102 -</b> |
| <i>C.I. Méthodes</i>                                                                                | - 103 -        |
| C.I.1- Obtention de populations leucocytaires / Séparation des PN / Validation de la procédure      | - 104 -        |
| C.I.1.1 Procédure de séparation des polynucléaires à partir de sang total                           | - 104 -        |
| C.I.1.11 Matériel et réactifs                                                                       | - 105 -        |
| C.I.1.12 Protocole de séparation                                                                    | - 106 -        |
| C.I.1.13 Préparation de plasma dépourvu en plaquettes                                               | - 107 -        |
| C.I.1.14 Préparation de plasma riche en plaquettes                                                  | - 107 -        |
| C.I.1.2 Détermination de la pureté des suspensions de polynucléaires obtenues                       | - 108 -        |
| C.I.1.21 Numération ADVIA 2120®                                                                     | - 108 -        |
| C.I.1.22 Formule leucocytaire au microscope après étalement par Cytospin3®                          | - 109 -        |
| C.I.1.23 Evaluation de la contamination plaquettaire                                                | - 109 -        |
| C.I.1.24 Evaluation de la contamination monocyttaire                                                | - 110 -        |
| C.I.1.25 Conclusion                                                                                 | - 110 -        |
| C.I.1.3 Vérification de la fonctionnalité et de la réactivité des PN après isolement                | - 110 -        |
| C.I.1.31 Etude de la production d'espèces réactives de l'oxygène par chimiluminescence              | - 111 -        |
| C.I.1.32 Etude de l'expression de marqueurs de surface en cytométrie de flux                        | - 113 -        |
| C.I.1.4 Conclusion                                                                                  | - 116 -        |
| Références                                                                                          | - 117 -        |
| C.I.2- Thromboélastométrie                                                                          | - 118 -        |
| Références                                                                                          | - 122 -        |
| C.I.3- Thrombinographie et méthode CAT®                                                             | - 123 -        |
| <i>C.II. Influence de PN issus de sujets sains sur la coagulation étudiée par méthodes globales</i> | - 128 -        |
| C.II.1- Préambule                                                                                   | - 129 -        |
| C.II.2- Influence sur la constitution du caillot étudiée par Thromboélastométrie (ROTEM®)           | - 130 -        |
| C.II.2.1 Objectifs                                                                                  | - 130 -        |
| C.II.2.2 Matériel et réactifs                                                                       | - 130 -        |
| C.II.2.3 Protocoles expérimentaux                                                                   | - 131 -        |
| C.II.2.31 Général                                                                                   | - 131 -        |
| C.II.2.32 Influence de la voie du facteur tissulaire                                                | - 131 -        |
| C.II.2.33 Influence de la voie intrinsèque                                                          | - 131 -        |
| C.II.2.34 Influence de l'état d'activation des PN                                                   | - 131 -        |
| C.II.2.35 Analyse statistique                                                                       | - 131 -        |
| C.II.2.4 Résultats                                                                                  | - 132 -        |
| C.II.2.41 Comparaison profils et paramètres PN-RP vs PRP vs PPP                                     | - 133 -        |
| C.II.2.42 Influence de la voie du facteur tissulaire                                                | - 133 -        |
| C.II.2.43 Influence de la voie intrinsèque                                                          | - 133 -        |
| C.II.2.44 Influence de la stimulation des PN par le fMLP                                            | - 140 -        |
| C.II.2.5 Discussion complémentaire                                                                  | - 142 -        |
| C.II.3- Influence sur la génération de thrombine étudiée par Thrombinographie (CAT®)                | - 145 -        |
| C.II.3.1 Objectifs                                                                                  | - 145 -        |
| C.II.3.2 Matériel et réactifs                                                                       | - 145 -        |

|                                                                                                                                                    |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| C.II.3.3 Protocoles expérimentaux                                                                                                                  | - 146 - |
| C.II.3.31 Général                                                                                                                                  | - 146 - |
| C.II.3.32 Influence de l'état d'activation des PN                                                                                                  | - 146 - |
| C.II.3.33 Influence de la concentration en PN                                                                                                      | - 146 - |
| C.II.3.34 Analyse statistique                                                                                                                      | - 147 - |
| C.II.3.4 Résultats                                                                                                                                 | - 148 - |
| C.II.3.41 PN-RP vs PPP vs PDP                                                                                                                      | - 148 - |
| C.II.3.42 Influence de l'état d'activation des PN                                                                                                  | - 150 - |
| C.II.3.43 Influence de la concentration en PN                                                                                                      | - 151 - |
| C.II.3.5 Discussion                                                                                                                                | - 152 - |
| Références                                                                                                                                         | - 158 - |
| C.II.4- Conclusion                                                                                                                                 | - 160 - |
| <i>C.III. Etude de l'impact sur la coagulation des enzymes granulocytaires, Cathepsine G et élastase, par méthodes globales</i>                    | - 161 - |
| C.III.1- Préambule                                                                                                                                 | - 162 - |
| C.III.2- Influence sur la constitution du caillot étudiée par Thromboélastométrie (ROTEM®)                                                         | - 163 - |
| C.III.2.1 Objectifs                                                                                                                                | - 163 - |
| C.III.2.2 Matériel et réactifs                                                                                                                     | - 163 - |
| C.III.2.3 Protocoles expérimentaux                                                                                                                 | - 164 - |
| C.III.2.31 Cinétique de formation du caillot après recalcification simple : NATEM®                                                                 | - 164 - |
| C.III.2.32 Cinétique de formation du caillot après activation de la voie intrinsèque : INTEM®                                                      | - 164 - |
| C.III.2.33 Analyse statistique                                                                                                                     | - 164 - |
| C.III.2.4 Résultats                                                                                                                                | - 165 - |
| C.III.2.41 Cinétique de formation du caillot après recalcification simple                                                                          | - 165 - |
| C.III.2.42 Cinétique de formation du caillot après activation de la voie intrinsèque                                                               | - 166 - |
| C.III.2.5 Discussion                                                                                                                               | - 168 - |
| Références                                                                                                                                         | - 172 - |
| C.III.2- Influence sur la génération de thrombine étudiée par thrombinographie (CAT®)                                                              | - 174 - |
| C.III.2.1 Avant-propos et objectifs                                                                                                                | - 174 - |
| C.III.2.2 Effects of human neutrophil cathepsin G on in vitro coagulation: both accelerated thrombin generation and decreased thrombin work.       | - 175 - |
| Summary                                                                                                                                            | - 175 - |
| Introduction                                                                                                                                       | - 176 - |
| Materials and methods                                                                                                                              | - 177 - |
| Statistical analysis                                                                                                                               | - 180 - |
| Results                                                                                                                                            | - 181 - |
| Discussion                                                                                                                                         | - 186 - |
| References                                                                                                                                         | - 189 - |
| C.III.2.3 Effects of human neutrophil elastase on in vitro thrombin generation                                                                     | - 193 - |
| Summary                                                                                                                                            | - 193 - |
| Introduction                                                                                                                                       | - 193 - |
| Materials and methods; Statistical analysis                                                                                                        | - 194 - |
| Results                                                                                                                                            | - 195 - |
| Discussion                                                                                                                                         | - 200 - |
| References                                                                                                                                         | - 203 - |
| C.III.2.4 Mesure de l'activité anticoagulante du TFPI plasmatique                                                                                  | - 208 - |
| C.III.2.41 Matériel et réactifs                                                                                                                    | - 208 - |
| C.III.2.42 Protocole expérimental                                                                                                                  | - 208 - |
| C.III.2.43 Résultats (N=4) et conclusion                                                                                                           | - 209 - |
| C.III.3- Conclusion                                                                                                                                | - 211 - |
| <i>C.IV. Une application en Recherche clinique :</i>                                                                                               | - 213 - |
| « Evaluation de la contribution des polynucléaires dans la thrombogenèse au cours des syndromes myéloprolifératifs JAK2 <sup>V617F</sup> positif » | - 213 - |
| C.IV.1- Objectifs / hypothèses de travail                                                                                                          | - 214 - |
| C.IV.2- Patients et méthodes                                                                                                                       | - 214 - |
| C.IV.2.1 Sujets                                                                                                                                    | - 214 - |
| C.IV.2.11 Population-patient                                                                                                                       | - 214 - |
| C.IV.2.12 Population-témoin                                                                                                                        | - 215 - |
| C.IV.2.2 Prélèvements sanguins                                                                                                                     | - 215 - |

|                                                                                                       |                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| C.IV.2.3 Protocoles expérimentaux                                                                     | - 215 -        |
| C.IV.2.4 Analyse statistique                                                                          | - 216 -        |
| C.IV.3- Résultats                                                                                     | - 217 -        |
| C.IV.3.1 Caractéristiques des populations étudiées                                                    | - 217 -        |
| C.IV.3.2 Tests de génération de thrombine                                                             | - 217 -        |
| C.IV.3.21 Pré-requis – confirmation de l’effet procoagulant des PN                                    | - 217 -        |
| C.IV.3.22 Génération de thrombine à l’état basal                                                      | - 217 -        |
| C.IV.3.23 Comparaison des différences $\Delta$                                                        | - 220 -        |
| C.IV.3.24 Effet de la concentration en PN                                                             | - 221 -        |
| C.IV.3.25 Comparaison Polyglobulie de Vaquez / Thrombocytémie Essentielle                             | - 222 -        |
| C.IV.4- Discussion                                                                                    | - 222 -        |
| Références                                                                                            | - 228 -        |
| <b>D. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>                                                         | <b>- 229 -</b> |
| <b>Annexes</b>                                                                                        | <b>- 236 -</b> |
| <b>Annexe 1 : Syndromes myéloprolifératifs : Polyglobulie de Vaquez et Thrombocytémie essentielle</b> | <b>- 237 -</b> |
| 1. Définitions                                                                                        | - 237 -        |
| 2. Polyglobulie de Vaquez                                                                             | - 237 -        |
| 3. Thrombocytémie essentielle                                                                         | - 238 -        |
| <b>Annexe 2 : Référentiels internationaux des critères diagnostiques de SMP (TE et PV)</b>            | <b>- 240 -</b> |
| <b>Annexe 3 : Fiche de renseignement patient</b>                                                      | <b>- 242 -</b> |

# Index des figures

|                                                                                                                                                                                                                 |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Figure 1 : Polynucléaire neutrophile sur un frottis sanguin coloré au MGG (grossissement X1000) .....                                                                                                           | 21 -  |
| Figure 2 : Contenu des granulations du PN (d'après Segal, 2005).....                                                                                                                                            | 22 -  |
| Figure 3 : Recrutement du PN (d'après Bouaouina, 2006).....                                                                                                                                                     | 24 -  |
| Figure 4 : Mécanismes effecteurs antimicrobiens du PN (d'après Witko-Sarsat, 2000).....                                                                                                                         | 27 -  |
| Figure 5 : Structure tertiaire et organisation du site catalytique de la Cath G et de l'HNE, d'après Korkmaz, 2007 .....                                                                                        | 32 -  |
| Figure 6 : Modèle cellulaire de la coagulation (d'après Hoffman, 2003).....                                                                                                                                     | 40 -  |
| Figure 7 : Principaux inhibiteurs de la coagulation (d'après Aiach, 1995 ; Guillin, 1995). .....                                                                                                                | 41 -  |
| Figure 8 : Exemples d'interactions entre PN et plaquettes (d'après Zarbock, 2007).....                                                                                                                          | 56 -  |
| Figure 9 : Sites de clivage du TFPI par l'HNE (en rouge) et la Cath G (en bleu) .....                                                                                                                           | 71 -  |
| Figure 10 : Séquence peptidique du site réactif de l'AT et site de clivage par l'HNE.....                                                                                                                       | 71 -  |
| Figure 11 : Structure tertiaire de l'AT et site de clivage par l'HNE .....                                                                                                                                      | 72 -  |
| Figure 12 : Action de la Cathepsine G sur les facteurs vitamineK-dépendants (F=Phe ; W=Trp ; Y=Tyr) d'après Turkington, 1993.....                                                                               | 73 -  |
| Figure 13 : Exemple de mécanismes d'activation et d'inactivation des PARs (d'après Ossovskaia, 2004)....                                                                                                        | 76 -  |
| Figure 14 : Corrélation entre les marqueurs d'activation granulocytaire et les marqueurs d'hypercoagulabilité entre les patients et les témoins (d'après Falanga, 2000).....                                    | 92 -  |
| Figure 15 : Résultats des études de plusieurs cohortes italiennes de patients atteints de syndromes myéloprolifératifs concernant l'association thrombose et leucocytose (d'après Marchetti & Falanga, 2009) .. | 94 -  |
| Figure 16 : Densité des cellules sanguines.....                                                                                                                                                                 | 104 - |
| Figure 17 : Isolement sur Polymorphprep®.....                                                                                                                                                                   | 106 - |
| Figure 18 : Isolats de PN après étalement par Cytospin3® et coloration MGG (Gauche) grossissement x 100 ; (Droite) grossissement x 400 .....                                                                    | 109 - |
| Figure 19 : Réactivité des isolats de PN en chimiluminescence .....                                                                                                                                             | 113 - |
| Figure 20 : Réactivité des isolats de PN en cytométrie de flux.....                                                                                                                                             | 115 - |
| Figure 21 : Dispositif ROTEM et principe de la thromboélastométrie (d'après Bauters, 2007).....                                                                                                                 | 119 - |
| Figure 22 : Paramètres ROTEM® issus de la courbe primaire (haut) et dérivée première (bas).....                                                                                                                 | 120 - |
| Figure 23 : Courbe de génération de thrombine obtenue en PPP (FT 5 pM et PLa 4 µM) .....                                                                                                                        | 124 - |
| Figure 24 : Récapitulatif protocoles expérimentaux (ROTEM®).....                                                                                                                                                | 132 - |
| Figure 25 : TEMogram-type de PN-RP stimulés ou non par du fMLP.....                                                                                                                                             | 141 - |
| Figure 26 : Inhibition de la voie du facteur tissulaire par HTF-1 après stimulation des PN par le fMLP.....                                                                                                     | 141 - |
| Figure 27 : Récapitulatif des protocoles expérimentaux (CAT®) .....                                                                                                                                             | 147 - |
| Figure 28 : Exemple de plan de plaque CAT® (puits rouge : échantillons ; puits jaune : calibrant).....                                                                                                          | 148 - |
| Figure 29 : Influence des PN sur la génération de travail thrombinique .....                                                                                                                                    | 149 - |
| Figure 30 : Influence de la stimulation des PN par le fMLP sur la génération de travail thrombinique .....                                                                                                      | 150 - |
| Figure 31 : Influence de la concentration en PN sur la génération de travail thrombinique.....                                                                                                                  | 151 - |
| Figure 32 : Etude de l'influence de la cathepsine G et de l'élastase sur la coagulation en thromboélastométrie : exemples de TEMogram obtenus avec le test NATEM® (en PRP) .....                                | 165 - |
| Figure 33 : Etude de l'influence de la cathepsine G et de l'élastase sur la coagulation en thromboélastométrie : exemples de TEMogram obtenus avec le test INTEM® (en PPP). .....                               | 167 - |
| Figure 34 : Typical impact of Cath G on thrombin generation in normal plasmas.....                                                                                                                              | 182 - |
| Figure 35 : Cath G impact on thrombin generation in commercially factor XII-depleted plasma, in the presence or absence of TF triggering. ....                                                                  | 183 - |
| Figure 36 : Cath G impact on thrombin generation in factor V- and factor X-depleted plasma. ....                                                                                                                | 183 - |
| Figure 37 : Cath G impact on thrombin generation in the absence of amplification by intrinsic tenase. ....                                                                                                      | 184 - |
| Figure 38 : Cath G impact on thrombin generation in TFPI-depleted plasma.....                                                                                                                                   | 184 - |
| Figure 39 : Antithrombin-depleted plasma: raw fluorescent data signals.....                                                                                                                                     | 185 - |
| Figure 40 : Typical impact of HNE on thrombin generation in normal plasmas. ....                                                                                                                                | 196 - |
| Figure 41 : HNE impact on thrombin generation in commercially factor XII-depleted plasma, in the presence or absence of TF triggering.....                                                                      | 197 - |
| Figure 42 : HNE impact on thrombin generation in commercially, factor V- and factor X-depleted plasma.....                                                                                                      | 197 - |
| Figure 43 : HNE impact on thrombin generation in the absence of amplification by intrinsic tenase. ....                                                                                                         | 198 - |
| Figure 44 : HNE impact on thrombin generation in TFPI-depleted plasma. ....                                                                                                                                     | 198 - |
| Figure 45 : Antithrombin-depleted plasma: raw fluorescent data signals.....                                                                                                                                     | 199 - |
| Figure 46 : Effet de la Cathepsine G sur l'activité du TFPI plasmatique (N=4).....                                                                                                                              | 209 - |

|                                                                                                                          |         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Figure 47 : Effet de l'élastase sur l'activité du TFPI plasmatique (N=4) .....                                           | - 209 - |
| Figure 48 : Paramètres CAT® en PDP entre patients et témoins (* $P < 0,05$ ; NS non significatif) .....                  | - 219 - |
| Figure 49: Profils-type de génération de thrombine dans la population-témoin et la population-patient .....              | - 220 - |
| Figure 50 : Comparaison des paramètres CAT® à l'état basal (sans PCa), selon la pathologie et selon le statut JAK2 ..... | - 224 - |

# Index des tableaux

|                                                                                                                                                                                           |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Tableau 1 : Résumé des caractéristiques principales de l'HNE et de la Cath G.....                                                                                                         | - 33 -  |
| Tableau 2 : Activités biologiques potentielles de Cath G et HNE (hors activité antibiotique), .....                                                                                       | - 36 -  |
| Tableau 3 : Nombre de sites et efficacité catalytique d'assemblage de la prothrombinase à la surface de<br>différentes cellules sanguines (d'après Bouchard, 2003) .....                  | - 53 -  |
| Tableau 4 : Résumé des activités de la Cath G sur les facteurs de coagulation .....                                                                                                       | - 74 -  |
| Tableau 5 : Résumé des activités de l'HNE sur les facteurs de coagulation .....                                                                                                           | - 74 -  |
| Tableau 6 : Comparaison de la numération plaquettaire par hématimétrie et par CMF.....                                                                                                    | - 110 - |
| Tableau 7 : Plan expérimental d'étude de la réactivité des isolats de PN en chimiluminescence .....                                                                                       | - 112 - |
| Tableau 8 : Influence de la stimulation des PN par le fMLP sur les paramètres ROTEM® (N=7 ; résultats<br>exprimés en moyenne +/- écart-type).....                                         | - 140 - |
| Tableau 9 : Implication de la voie du facteur tissulaire par HTF-1 dans l'effet observé après stimulation des PN<br>par le fMLP (N=3 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type)..... | - 142 - |
| Tableau 10 : Comparaison de l'effet de la présence de PN dans le plasma sur la génération de travail<br>thrombinique (N=10 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type).....           | - 149 - |
| Tableau 11 : Comparaison de l'influence de l'état d'activation des PN sur la génération de travail thrombinique<br>(N=5 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type).....              | - 150 - |
| Tableau 12 : Comparaison de l'influence de la concentration en PN sur la génération de travail thrombinique<br>(N=6 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type).....                  | - 151 - |
| Tableau 13 : Influence de la cathepsine G et de l'élastase sur les paramètres ROTEM® dans les conditions de<br>test NATEM® (N=5 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type).....      | - 166 - |
| Tableau 14 : Influence de la cathepsine G et de l'élastase sur les paramètres ROTEM® dans les conditions de<br>test INTEM® (N=5 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type).....      | - 167 - |
| Tableau 15 : Effects of Cath G on thrombograms parameters in normal plasmas. Results are presented as mean<br>± SD; .....                                                                 | - 181 - |
| Tableau 16 : Effects of HNE on thrombograms parameters in normal plasmas (PRP, PPM and PDP). Results<br>are presented as mean ± SD.....                                                   | - 195 - |
| Tableau 17 : Caractéristiques clinico-biologiques principales des sujets inclus dans l'étude.....                                                                                         | - 218 - |
| Tableau 18 : Comparaison des paramètres de génération de thrombine au sein des 2 populations.....                                                                                         | - 219 - |
| Tableau 19 : Comparaison (valeur de P patients vs témoins) des différences Δ (par rapport au PDP et au PPP<br>5G/L). .....                                                                | - 220 - |
| Tableau 20 : Comparaison des paramètres de génération de thrombine au sein des 2 populations en fonction de<br>la concentration en PN (*N=20 ; **N=25).....                               | - 221 - |
| Tableau 21 : Comparaison des paramètres de génération de thrombine entre les patients atteints de PV et ceux<br>atteints de TE .....                                                      | - 222 - |

# Liste des publications

## Relatives au travail de Thèse

### Publications

☑ Influence of polymorphonuclear leukocytes on the plasma clot formation observed by thromboelastometry (ROTEM®).

**J Perrin**, L Morlon, C Vigneron, M Marchand-Arvier.  
Thromb Res. 2008;121(5):647-52.

☑ Effects of human neutrophil cathepsin G on in vitro coagulation: both accelerated thrombin generation and decreased thrombin work.

**J Perrin**, T Lecompte, A Brunette, L Morlon, M Marchand-Arvier, C Vigneron.  
SOU MIS

### Communications orales

☑ Les polynucléaires humains favorisent la coagulation *in vitro*.

**J Perrin**, N Sennoun, T Lecompte, C Vigneron, M Marchand-Arvier  
**Congrès de la Société française d'Hématologie (mars 2005 Paris)**

### Communications affichées

☑ Les polynucléaires : acteurs de la coagulation et rôle dans la thrombogenèse au cours des syndromes myéloprolifératifs JAK2<sup>V617F</sup> positif ?

**J Perrin**, D Ranta, P Feugier, C Vigneron, T Lecompte  
**III<sup>ème</sup> journée Claude Huriet de la Recherche médicale (nov 2007 Nancy)**

☑ Influence de deux sérine-protéases granulocytaires, cathepsine G et élastase, sur la coagulation du plasma.

L Morlon, **J Perrin**, M Marchand-Arvier, C Vigneron  
**Congrès de la Société Française d'Hématologie (mars 2007 Paris)**

### Mémoire de D.E.A. « Métabolisme et mécanisme d'action des médicaments – pharmacologie clinique »

« Vers la mise en évidence du rôle des polynucléaires humains dans la coagulation »  
soutenu en juin 2005

## Autres

### Publications

☑ Acanthocytosis in Anderson's disease.

JF Lesesve, **J Perrin**, A Georges, A Morali. Br J Haematol. 2009 Apr;145(1):1.

☑ Thrombopénies induites à l'héparine et circulation extra-corporelle pour chirurgie cardiaque : quelle anticoagulation en 2008 ?

M Durand, J Devignes, M Hacquard, **J Perrin**, M Hirschi, JP Carteaux, T Lecompte  
Sang Thrombose Vaisseaux. 2009 Fév ;21(2):1-7.

☑ Acanthocytes et hypocholestérolémie

**J Perrin**, A Georges, A Morali, C Vigneron, T Lecompte, J F Lesesve.  
Ann Biol Clin (Paris). 2008 Sep-Oct;66(5):569-72.

☑ Alpha-thalassémie acquise révélatrice d'un syndrome myélodysplasique de type anémie réfractaire avec hémochromatose secondaire.

**J Perrin**, A Perrot, V Chenot, JF Lesesve, A Guerci, M Marchand-Arvier, C Vigneron, T Lecompte.  
Ann Biol Clin (Paris). 2007 Jul 1;65(4):405-409.

☑ Une résistance globulaire osmotique normale n'exclut pas une membranopathie érythrocytaire ! À propos d'un cas d'elliptocytose héréditaire.

**J Perrin**, M Marchand-Arvier, V Latger-Cannard, C Vigneron, T Lecompte.  
Ann Biol Clin (Paris). 2006 Sep-Oct;64(5):491-5.

### Communications orales

☑ Orage thrombotique : et si c'était multifactoriel ?

**S Zuily, J Perrin**, M Toussaint-Hacquard, L Saadi, D Barraud, T Lecompte, PE Bollaert, D Wahl

**Congrès du Collège Français de Pathologie Vasculaire (mars 2009 Paris)**

☑ Inequivalence and inter-subject variability of 7 antithrombin-dependent anticoagulants evaluated by CAT®.

**J Perrin**, M Hacquard, C Vigneron, T Lecompte

**52nd GTH Congress (fév 2008, Wiesbaden, Allemagne)**

☑ Thrombopénies Induites par l'Héparine : CAS CLINIQUES.

**E André, J Perrin**, M Toussaint-Hacquard, A Mulet

**Congrès du Club des Techniciens en Hémostase (mai 2005 Nancy)**

### Communications affichées

☑ Assessment of coagulation phenotype modification in orthopaedic surgery patients receiving antithrombotic prophylaxis by enoxaparin.

M Hacquard, G Conroy, S Mayot, **J Perrin**, S Collin, T Lecompte

**52nd GTH Congress (fév 2008 Wiesbaden, Allemagne)**

☑ Evaluation du protocole thérapeutique d'utilisation du danaparoïde sodique élaboré par la COMEDIMS dans le cadre du Contrat de Bon Usage au CHU de Nancy.

A Duriez, A Mulet, M Toussaint-Hacquard, **J Perrin**, N Thilly, T Lecompte, A Perrin, I May.

**Congrès de la Société Française de Pharmacie Clinique (fév 2008 St Malo)**

☑ TIH insidieuse responsable d'un orage thrombotique chez une patiente atteinte d'un cancer digestif.

S Zuily, **J Perrin**, M Toussaint-Hacquard, L. Saadi, D. Barraud, T. Lecompte, P-E. Bollaert, D. Wahl.

**IV<sup>ème</sup> journée Claude Huriet de la Recherche médicale (déc 2008 Nancy)**

☑ Thrombopénie induite par l'héparine en réanimation médicale.

E Durand, **J Perrin**, F Empereur, T Lecompte, A Cravoisy, Gibot, PE Bollaert

**Congrès de la Société de réanimation de Langue Française (jan 2008 Paris)**

☑ Influence d'une plasmaphérèse sur le profil hémostatique étudié par thrombinographie.

**J Perrin**, M Toussaint-Hacquard, N Daguindau, C Jacquot, T Schneider, C Vigneron, T Lecompte

**Congrès de la Société Française de Vigilance et de Thérapeutique Transfusionnelle (nov 2006 Nancy)**

### Mémoire de D.E.S. « Pharmacie Spécialisée »

« Inéquivalence et variabilité de profil d'anticoagulation in vitro étudié par thrombinographie de 6 héparines de bas poids moléculaire et du fondaparinux »  
soutenu le 25 octobre 2007



# Abréviations

|                                                                   |                                                    |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| $\alpha$ 2M : alpha-2 macroglobuline                              | MAXV : vitesse maximum                             |
| AT : antithrombine                                                | MAXV-t : temps pour obtenir MAXV                   |
| AUC : area under the curve                                        | MCF : Maximum Clot Firmness                        |
| AVK : antagoniste de la vitamine K                                | MCF-t : temps pour obtenir MCF                     |
| BPI : bactericidal/permeability-increasing protein                | MGG : May Grünwald Giemsa                          |
| CAT® : calibrated automated thrombogram                           | MP : microparticules                               |
| Cath G : cathepsine G                                             | MPO : Myéloperoxydase                              |
| CFT : clot formation time                                         | NAP-2 : neutrophil-activating peptide 2            |
| CMF : cytométrie de flux                                          | NET : neutrophil extracellular trap                |
| CT : clotting time                                                | PAF : platelet-activating factor                   |
| CTI : corn trypsin inhibitor                                      | PAL : phosphatase alcaline leucocytaire            |
| DMSO : diméthylsulfoxyde                                          | PAR-x : protease-activated receptor x              |
| EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique                      | PB : polynucléaire basophile                       |
| EGFR : epidermal growth factor receptor                           | PC : protéine C                                    |
| EPCR : endothelial protein C receptor                             | PCa : protéine C activée                           |
| EROs: espèces réactives de l'oxygène                              | PDP plasma dépourvu en plaquettes                  |
| ETP : potentiel thrombinique endogène                             | PE : polynucléaire éosinophile                     |
| fMLP : N-formyl-Met-Leu-Phe                                       | PLa : phospholipides anioniques                    |
| FT : facteur tissulaire                                           | PMA : phorbol myristate acetate                    |
| Fx : facteur x                                                    | PN : polynucléaire neutrophile                     |
| Fxa : facteur x activé                                            | PN-RP : plasma riche en polynucléaires             |
| GAG : glycosaminoglycanes                                         | PPP : plasma pauvre en plaquettes                  |
| GBEA : guide de bonne execution des analyses de biologie médicale | PRP : plasma riche en plaquettes                   |
| GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor         | PS : protéine S                                    |
| Hb : hémoglobine                                                  | PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1          |
| HBPM : héparine de bas poids moléculaire                          | PV : polyglobulie de Vaquez                        |
| HCII : heparin cofactor II                                        | ROTEM® : rotative thromboelastometry               |
| HNE : human neutrophil elastase                                   | SLPI : secretory leukocyte protease inhibitor      |
| HNF : héparine non fractionnée                                    | SMP : syndrome myéloprolifératif                   |
| Ht : hématocrite                                                  | TAFI : thrombin activatable fibrinolysis inhibitor |
| HTA : hypertension artérielle                                     | TE : thrombocytémie essentielle                    |
| ICAM : Intercellular adhesion molecules                           | TFPI : tissue factor pathway inhibitor             |
| Ig : immunoglobuline                                              | TIH : thrombopénie induite par l'héparine          |
| IL8 : interleukine 8                                              | TM : thrombomoduline                               |
| KHPM : kininogène de haut poids moléculaire                       | VPM : volume plaquettaire moyen                    |
| LPS : lipopolysaccharide                                          | YFP : yellow fluorescent protein                   |



# **PREAMBULE**

Les polynucléaires neutrophiles (PN) sont les principaux agents cellulaires impliqués dans le mécanisme inflammatoire qui a pour but de recruter rapidement les leucocytes sur le lieu d'une lésion ou d'une infection [Wagner, 2005]. Or, il existe des liens étroits entre Inflammation et Coagulation [Williams, 2007]. Des désordres inflammatoires ou une réponse inappropriée peuvent aboutir à des perturbations de la coagulation telle qu'une coagulation intravasculaire disséminée.

Ainsi il est légitime d'imaginer que les PN puissent, en plus de leur rôle prépondérant dans les mécanismes inflammatoires, avoir en parallèle un impact, voire une implication active dans les mécanismes de la coagulation.

Cette hypothèse n'est pas récente. Dès la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, de nombreux anatomo-pathologistes ont noté la présence, en nombre non négligeable, d'éléments nucléés au sein même des thrombi, éléments cellulaires identifiés comme des leucocytes.

Welch, en 1887, concluait déjà ses travaux de la sorte :

*« Si constante et si abondante qu'est la présence de ces éléments (leucocytes) dans les thrombi post-mortem, qu'aucun anatomo-pathologiste ne peut sans hésiter admettre que leur présence est fortuite ou inutile pour notre conception de la nature des processus thrombotiques »*

Cependant ce sujet était (déjà) un point de controverse, notamment suite aux conclusions de Eberth et Schimmelbusch en 1888 :

*« Nous avons trouvé que les plaquettes sanguines sont un facteur **intégrant** dans le développement de ces thrombi et que la présence de globules blancs et d'érythrocytes n'est le fait que d'un emprisonnement accidentel »*

Dans les années 1960, Henry, en utilisant un modèle de lésions des veines jugulaires externes chez le rat, a montré que le nombre de leucocytes dans les thrombi intravasculaires ainsi induits augmentait au cours du temps et s'enrichissait par rapport au sang circulant. Toutefois, les types de leucocytes observés étaient assez mal définis, certains arborant une forme qualifiée par l'auteur de « bizarre ». Il semble tout de même qu'après quelques minutes, une grande partie des cellules appartienne à la lignée granulocytaire alors que les lymphocytes, qui représentent physiologiquement plus de deux tiers des globules blancs chez

les rats testés, ne sont qu'occasionnellement présents [Henry, 1965]. Ces observations soutiennent ainsi l'hypothèse que la présence abondante des granulocytes à l'intérieur des caillots n'est pas simplement due à un emprisonnement passif lors de la constitution de ceux-ci.

Ce postulat est étayé par le fait que plusieurs molécules, libérées ou intervenant lors de la coagulation, attirent les PN par chimiotactisme. En premier lieu, la thrombine, enzyme-clé de tout le système [Morin, 1990], est capable d'attirer les PN sur le lieu de sa génération uniquement, car son précurseur plasmatique, la prothrombine (FII) n'exerce aucune activité de la sorte. De plus, le segment responsable est indépendant du site catalytique et du site de liaison du fibrinogène [Morin, 1990].

C'est également le cas de certaines chemokines plaquettaires, contenues dans les  $\alpha$ -granules et libérées en grande quantité après activation plaquettaire, et donc par conséquent, abondamment présentes dans le micro-environnement lors de la formation d'un caillot [Brandt, 2000] : citons par exemple les  $\beta$ -thromboglobulines comme le NAP-2 (Neutrophil-activating peptide 2) ou encore le facteur 4 plaquettaire, autre chemokine proche du NAP-2, également contenue dans les  $\alpha$ -granules plaquettaires, à qui est attribué un rôle dans la régulation de l'adhérence des PN aux cellules endothéliales. Toutefois, sa capacité à attirer les PN par chimiotactisme est controversée [Seely, 2003 ; Brandt, 2000].

En 1992, l'équipe de Furie publie dans *Nature* des données qui démontrent le rôle de la P-sélectine dans le recrutement des leucocytes dans les caillots. Chez le babouin, dans un modèle *in vivo* de constitution d'un caillot (greffon dans une fistule artério-veineuse fémorale), l'accumulation de leucocytes est fortement réduite en présence d'un Ac anti-P-sélectine inhibiteur et sélectif. Cette accumulation est liée aux dépôts de fibrine, mais le type de leucocytes recrutés n'est pas clair [Furie, 1992].

Suite à ces travaux, plusieurs équipes ont développé des modèles *ex vivo* de thrombogénèse en chambre de perfusion.

Kirchhofer a utilisé un modèle d'effraction vasculaire où du sang total issu de donneurs sains est passé, en condition de flux veineux ( $\text{shear rate} = 65 \text{ s}^{-1}$ ), dans une chambre en plexiglas, coatée par du collagène III et anticoagulée par un inhibiteur direct de la thrombine [Kirchhofer, 1997]. Le type de leucocytes potentiellement immobilisés est ensuite déterminé par coloration ou mesure de marqueurs de surface en cytométrie en flux. Dans ces conditions, une accumulation majoritaire de PN a été observée ( $> 75\%$  des leucocytes immobilisés). Cette

accumulation n'est pas complètement inhibée par un Ac anti P-sélectine, ce qui suggère que l'adhérence et le recrutement ne se font pas exclusivement par cette voie. Les auteurs avancent à ce titre l'hypothèse d'un rôle de la glycoprotéine plaquettaire IIbIIIa.

Hagberg a utilisé une méthodologie similaire, mais en conditions de flux artériel (shear rate=2600 s<sup>-1</sup>) [Hagberg, 1998]. Le type de leucocytes est cette fois apprécié uniquement sur critère morphologique après coloration et non à l'aide de marqueurs de surface en CMF. En revanche, une étude de marqueurs d'adhérence leucocytaire et du fibrinogène associé aux cellules a été réalisée en CMF en prélevant des échantillons sanguins en pré- et en post-chambre. Les résultats font état d'une augmentation de l'adhérence des PN au thrombi au cours du temps (x50 entre 5 min et 15 min). Cette fois, 99% des leucocytes immobilisés sont des PN. Ces résultats sont assez éloignés de ceux de Kirchhofer, mais les auteurs suggèrent que le recrutement des leucocytes dans les thrombi dépend de l'intensité du flux, notamment car PSGL-1, récepteur leucocytaire de la P-Sélectine, a un profil de glycosylation différent selon les conditions artérielles ou veineuses. Il semble que le recrutement se fasse de façon indépendante des dépôts de fibrine, les PN étant observés dans les zones avec ou sans fibrine. En outre, les données concernant les marqueurs d'adhérence leucocytaire sont assez surprenantes car aucune différence significative n'a pu être mise en évidence par rapport aux perfusions « contrôle » (chambre sans collagène). Ce qui peut être expliqué par le fait que les PN activés ont adhéré au caillot, et ne sont de ce fait plus présents dans le sang circulant en post-chambre.

Il est aujourd'hui admis que les PN font partie intégrante de la constitution du caillot ; cependant le but dans lequel ceux-ci sont recrutés est loin d'être élucidé :

***- quels pourraient être les rôles des PN dans la constitution du caillot et plus généralement dans la coagulation ?***

***- par quels mécanismes ces cellules pourraient-elles influencer sur le déroulement de la coagulation et surtout est-ce pour la favoriser (propriétés procoagulantes) ou pour la freiner (propriétés anticoagulantes) ?***

Les polynucléaires neutrophiles sont connus depuis plusieurs décennies pour avoir la capacité d'influer sur l'hémostase au sens large du terme [Saba, 1973 ; Niemetz, 1973], par intervention aussi bien dans l'hémostase primaire, la coagulation ou la fibrinolyse. Cependant, comme nous allons le détailler en focalisant notre propos sur les données concernant la

coagulation (ou plutôt les mécanismes aboutissant à la génération de thrombine), il existe quantité de données contradictoires, ce qui rend difficile la compréhension de leur rôle potentiel. En conséquence, ce travail a pour objectif de déterminer l'impact des PN sur la coagulation à l'aide de méthodes globales d'étude du processus.

## Références

- Brandt E, Petersen F, Ludwig A, Ehlert JE, Bock L, Flad HD. The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J Leukoc Biol.* 2000;67:471-8.
- Eberth KL, Schimmelbusch C. Die Thrombose nach Versuchen und Leichenbefunden. Ferdinand Enke, Stuttgart, 1888, p 61.
- Hagberg IA, Roald HE, Lyberg T. Adhesion of leukocytes to growing arterial thrombi. *Thromb Haemost.* 1998;80:852-8.
- Henry RL. Leukocytes and thrombosis. *Thromb Diath Haemorrh.* 1965;13:35-46.
- Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood.* 1997;89:1270-8.
- Morin A, Arvier MM, Doutremepuich F, Vigneron C. Coagulation impact on chemotactic activity generation for polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Res.* 1990;59:979-84.
- Morin A, Arvier MM, Doutremepuich F, Vigneron C. Localization of the structural domain responsible for the chemotactic properties of thrombin on polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Res.* 1990;60:33-42.
- Niemetz J, Fani K. Thrombogenic activity of leukocytes. *Blood.* 1973;42:47-59.
- Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature.* 1992;359:848-51.
- Saba HI, Herion JC, Walker RI, Roberts HR. The procoagulant activity of granulocytes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1973;142:614-20.



- Seely AJ, Pascual JL, Christou NV. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. Crit Care. 2003;7:291-307.
- Wagner DD. New links between inflammation and thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:1321-4.
- Welch WH. The structure of white thrombi. Tr Path Soc. 1887;13:281-300.
- Williams JL et al. Cross talk between the inflammation and coagulation systems. Clin Lab Sci. 2007;20:224-9

# **A. ANALYSE**

## **BIBLIOGRAPHIQUE**

## **A.I. Rappels sur les polynucléaires neutrophiles**

Les polynucléaires neutrophiles sont les cellules nucléées les plus abondamment présentes dans le sang circulant, chez le sujet sain. Leur nombre se situe entre 1,8 et 7,5 G/L. Ils constituent un des pivots de l'immunité innée et un puissant système de défense de l'Homme contre des agents pathogènes, tels que les bactéries, les champignons, les parasites et autres virus qui auraient pu franchir la barrière cutané-muqueuse, sans oublier les structures reconnues comme étrangères (à l'instar des cellules ou molécules endogènes altérées).

### **A.I.1- Origine et maturation [Seely, 2003 ; Dale, 2008]**

Les PN sont formés dans la moelle osseuse, à partir d'une cellule souche multipotente, qui donnera naissance, sous l'influence de différentes cytokines, successivement à une cellule souche myéloïde puis à un progéniteur mixte des granulocytes et des monocytes/macrophages et enfin, à un progéniteur de la lignée granuleuse. Ce progéniteur va ensuite évoluer à travers différents stades de maturation cellulaire, successivement, myéloblaste, promyélocyte, myélocytes, métamyélocyte, pour enfin, après une douzaine de jours, aboutir au stade polynucléaire.

Les PN matures peuvent rester jusqu'à 5 jours dans la moelle osseuse où ils constituent la réserve médullaire. Ils passent ensuite dans la circulation sanguine. Une fois dans le compartiment sanguin, seule une partie des PN circule au sens propre du terme : en effet, environ la moitié des PN présents dans le compartiment est accolée à l'endothélium et constitue le pool marginal, mobilisable sous l'influence de divers facteurs (stress, exercice physique, inflammation ou encore la cortisone...).

La demi-vie dans le compartiment sanguin est courte puisqu'on estime qu'en 10 à 12 heures, la moitié des PN a quitté le sang pour migrer définitivement vers les tissus.

La très large majorité des fonctions physiologiques du PN s'exerce donc dans les tissus (voir ci-dessous).

### A.I.2- Morphologie

Au microscope optique, après étalement et coloration au MGG, le polynucléaire neutrophile mature apparaît comme une cellule arrondie et régulière de 12 à 15  $\mu\text{m}$  de diamètre. Son noyau est polylobé (d'où le terme de polynucléaire), le plus souvent constitué de 3 lobes, reliés entre eux par des ponts de chromatine. Son cytoplasme est légèrement acidophile (rosé), et parsemé de fines et nombreuses granulations (d'où le terme de granulocytes) de teinte marron à violet clair (figure 1).



**Figure 1 : Polynucléaire neutrophile sur un frottis sanguin coloré au MGG (grossissement X1000)**

Les granulations caractéristiques de la lignée granuleuse apparaissent successivement au cours de la maturation du précurseur granulocytaire, à partir du stade myéloblaste. Elles sont d'une grande hétérogénéité et classées en fonction de leur chronologie d'apparition, leur taille, leur morphologie et enfin de leur contenu (figure 2). Classiquement, on distingue [Borregaard, 2007 ; Segal, 2005] :

- **les granulations primaires (ou azurophiles)**, apparaissent les premières, et ne sont synthétisées qu'au stade promyélocyte. Elles sont formées d'une membrane entourant une matrice protéique caractérisée par la présence de myéloperoxydase (MPO). Les granulations azurophiles contiennent principalement des protéines et peptides directement impliqués dans les phénomènes d'élimination et de digestion des agents pathogènes, tels que le lysosyme, la cathepsine G, l'élastase, ou la BPI (bactericidal/permeability-increasing protein). La matrice protéique est constituée de protéoglycannes fortement chargés négativement et fixe de ce fait tous ces peptides et protéines qui sont cationiques (à l'exception du lysosyme), ce qui, ajouté au pH acide

maintenu à l'intérieur des granulations, permet, de conserver ces enzymes à l'état quiescent.

- **les granulations secondaires (ou spécifiques)**, apparaissent au stade myélocyte. Elles définissent le type de polynucléaires (neutrophile, éosinophile ou basophile). Elles sont également constituées d'une membrane entourant une matrice protéique caractérisée par l'absence de peroxydase. Le marqueur principal de ces granulations du neutrophile est la lactoferrine, capable de lier et de séquestrer le fer et le cuivre. On y trouve également 2/3 du lysosyme total et de la gélatinase.

- **les granulations tertiaires**, apparaissent au stade métamyélocyte. Elles sont caractérisées par la présence de gélatinase et l'absence de lactoferrine.

- enfin, **les vésicules sécrétoires**, apparaissant le plus tardivement en toute fin de maturation. Formées par endocytose, elles constituent donc un réservoir de constituants membranaires.

| Membrane proteins                                  |                                                                                        |                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Azuophil granules                                  | Specific granules                                                                      | Gelatinase granules      | Secretory vesicles                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| N.a.                                               | CD11b/CD18, CD66, CD67                                                                 | CD11b/CD18, CD67         | CD11b/CD18, CD67                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| N.a.                                               | Gp91phox/p22phox                                                                       | Gp91phox/p22phox         | Gp91phox/p22phox                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| N.a.                                               |                                                                                        | MMP25                    | MMP25                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| N.a.                                               | TNFR <sup>c</sup> , uPAR                                                               | TNFR <sup>c</sup>        | LIR1-4, -6, -7, -9 <sup>c</sup> ; CD35; CD16; C1q-R; IFN-αR1 and IFN-αR2 <sup>c</sup> ; IFN-γR1 and IFN-γR2 <sup>c</sup> ; TNFR1 and TNFR2 <sup>c</sup> ; IL-(1,4,6,10,13,17,18)R <sup>c</sup> ; TGF-βR2 <sup>c</sup> ; CXCR-1 <sup>c</sup> ; CXCR-2 <sup>c</sup> ; CXCR-4 <sup>c</sup> ; CCR-1, -2, -3 <sup>c</sup> ; Ig(G,A,E)FcR <sup>c</sup> ; TLR-1, -2, -4, -6, -8 <sup>c</sup> ; CD14; MyD88 <sup>c</sup> ; MD-2 <sup>c</sup> ; fMLPR; TREM1 <sup>c</sup> |
| CD63, CD68, presenilin                             | SNAP-23, VAMP-2, Stomatin, PGLYRP <sup>c</sup>                                         | SNAP-23, VAMP-2, Nramp1  | SNAP-23, VAMP-2, Nramp1, alkaline phosphatase, DAF, CD10, CD13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Matrix Proteins                                    |                                                                                        |                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Elastase, cathepsin G, proteinase 3                | Collagenase, Gelatinase, uPA, cystatin C <sup>c</sup> , cystatin F <sup>c</sup>        | Gelatinase, arginase 1   | Plasma proteins                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Defensins, BPI, MPO, lysozyme                      | hCAP18, NGAL, B12BP, lysozyme, lactoferrin, haptoglobin, pentraxin 3, prodefensin      | Lysozyme                 | N.a.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Sialidase, Azurocidin, β-glucuronidase, azurocidin | α1-anti-trypsin <sup>c</sup> , SLPI, orosomucoid, heparanase, β2-microglobulin, CRISP3 | β2-microglobulin, CRISP3 | N.a.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

<sup>a</sup>Abbreviations: B12BP, vitamin B12 binding protein; CRISP, cysteine-rich secretory protein; DAF, decay-accelerating factor; Gp, granule protein; LIR, immunoglobulin-like receptor; n.a., not applicable; uPA, urokinase plasminogen activator.

<sup>b</sup>Localization of proteins in the matrix and the membrane of neutrophil granules and secretory vesicles. The list is not completely exhaustive but illustrates the major classes of proteins found in the various types of neutrophil granules. Yellow, adhesion molecules; blue, receptors; orange, antibacterial proteins; green, proteases; colorless, other functional classes of proteins.

<sup>c</sup>The localization is inferred from the gene expression profile according to the targeting-by-timing hypothesis but has not been confirmed at the protein level.

**Figure 2 : Contenu des granulations du PN (d'après Segal, 2005)**

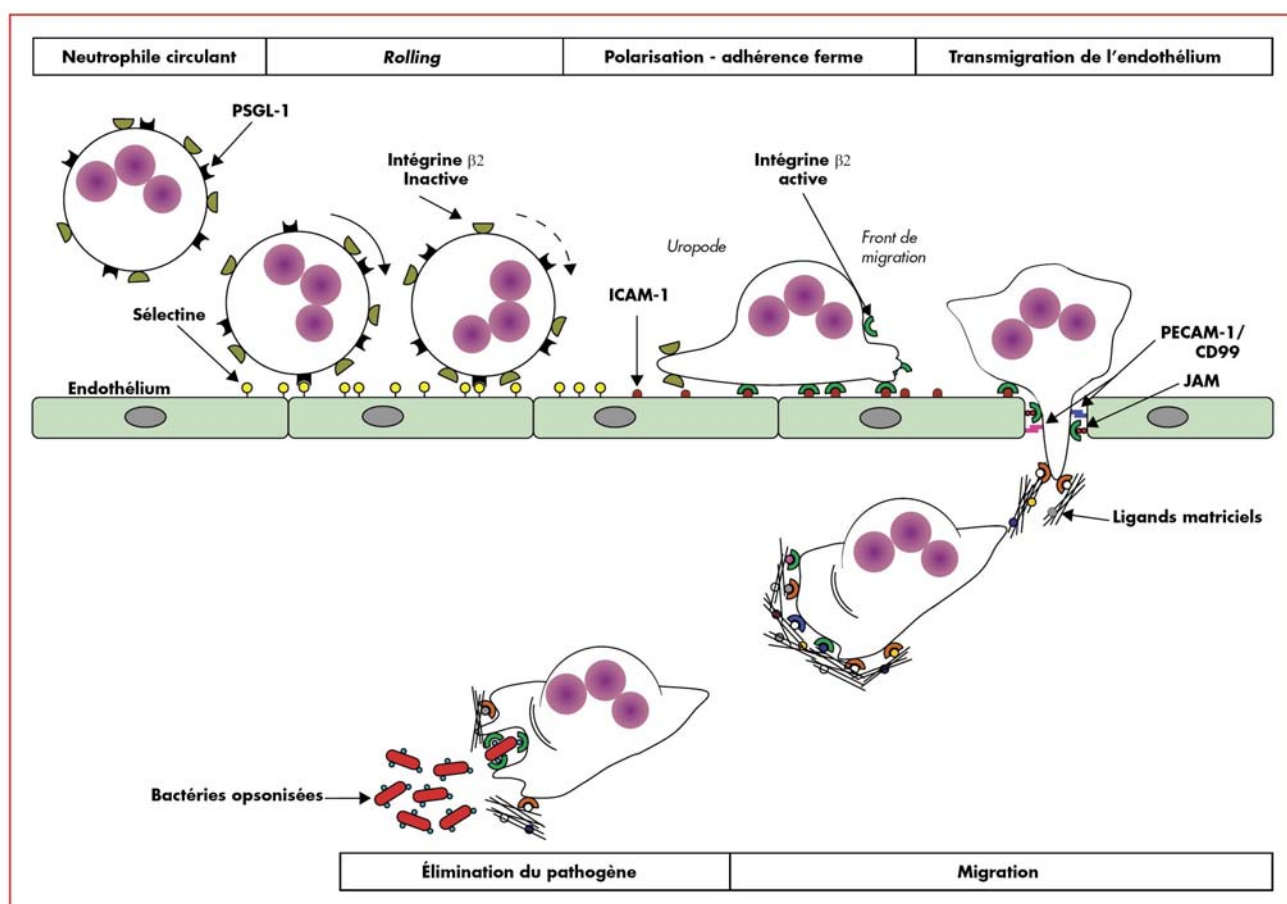
**A.I.3- Physiologie** [Witko-Sarsat, 2000 ; Gougerot-Pocidalo, 2002 ; Liu, 2003 ; Bouaouina, 2006 ; Cowburn, 2008]

Le PN est impliqué dans l'immunité innée et dans le processus inflammatoire. Pour exercer de telles fonctions, il dispose de propriétés spécifiques (figure 3) :

- Adhérence aux cellules endothéliales et passage dans les tissus par diapédèse
- Chimiotactisme et déplacement
- Adhérence aux agents pathogènes et phagocytose
- Activités « tueuses » et sécrétoires

#### **A.I.3.1 Adhérence aux cellules endothéliales et passage dans les tissus par diapédèse**

Le PN est rapidement recruté au niveau des sites inflammatoires. Une propriété remarquable est de pouvoir rapidement passer de l'état au repos (PN circulant) à celui de cellule activée et adhérente sous l'effet de stimuli inflammatoires provenant du foyer infectieux. Ces étapes sont parfaitement orchestrées par les molécules d'adhérence exprimées à la surface du PN, mais également à la surface des cellules endothéliales en réponse aux stimuli inflammatoires. Dans un premier temps, les PN vont adhérer de façon transitoire aux cellules endothéliales par l'intermédiaire de molécules de la famille des sélectines, ce qui permet une décélération des PN dans le flux sanguin à la surface des cellules endothéliales (*rolling*). Cette étape de ralentissement permet ensuite aux  $\beta 2$  intégrines (principalement CD11b/CD18) exprimées à la surface du PN activé d'interagir fermement avec leurs ligands endothéliaux (de la famille des molécules d'adhérence intercellulaire – ICAM) et ainsi d'immobiliser le PN à la surface endothéliale. Une fois immobilisé, le PN va pouvoir traverser l'endothélium par mise en place à l'avant de la cellule d'un front de migration avec émissions/projections membranaires.



**Figure 2.** Les différentes étapes du recrutement des neutrophiles sur les sites inflammatoires.

À l'approche du site inflammatoire, le neutrophile entre en contact avec l'endothélium activé par les stimuli inflammatoires. Les interactions réversibles entre les sélectines et leurs ligands ralentissent la course du neutrophile et le mettent en contact avec les stimuli inflammatoires exposés par l'endothélium. Ceci préactive le neutrophile et déclenche la signalisation *inside-out* activatrice des intégrines  $\beta 2$ .

La liaison des intégrines  $\beta 2$  à leurs ligands ICAM-1 est à l'origine de la polarisation et de l'adhérence ferme du leucocyte.

Le neutrophile se meut sur la surface de l'endothélium par des réactions d'adhérence des intégrines au niveau du front de migration, stabilisant les projections membranaires et une désadhérence au niveau de l'uropode, permettant sa rétraction et le recyclage des intégrines vers l'avant.

Au niveau de la jonction endothéliale et en collaboration avec le neutrophile, les cellules endothéliales desserrent leur jonction et offrent au leucocyte des ligands (JAM) de substitution pour ses intégrines  $\beta 2$ , en plus des interactions homophiles des molécules PECAM-1 et CD99 lui permettant de progresser à travers l'endothélium vers la matrice.

La migration dans la matrice met en jeu, en plus des intégrines  $\beta 2$ , d'autres types d'intégrines ( $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ...) qui se lient à des ligands matriciels divers.

Sur le site inflammatoire, les intégrines  $\beta 2$  participent au processus de phagocytose en liant spécifiquement le facteur C3 du complément opsonisant des bactéries.

**Figure 3 : Recrutement du PN (d'après Bouaouina, 2006)**

### A.I.3.2 Chimiotactisme et déplacement

Le PN a la capacité d'être attiré par des substances dites chimiotactiques ou chimioattractantes, qui proviennent de la cible infectieuse/inflammatoire ou dont la production est induite par la cible. Les principales substances sont les peptides N-formylés dérivés des protéines bactériennes, certaines fractions du complément (tel que C5a), le leucotriène B4 (LTB4), le « platelet activating factor » (PAF) ou encore l'interleukine 8 (IL8).

Les substances chimiotactiques vont se lier à la surface des PN par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques à sept domaines transmembranaires, couplés à une protéine G, responsable de la transduction du signal, permettant une mobilisation importante de l'actine (polymérisation/dépolymérisation).

Ces récepteurs aux chimioattractants permettent donc au PN de se déplacer et de s'orienter vers le foyer inflammatoire, dans le sens du gradient des stimuli et se concentrent au niveau du front de migration lors de la diapédèse.

Une fois traversée la barrière endothéliale, le PN doit migrer à travers la matrice extracellulaire jusqu'au foyer inflammatoire. Pour ce faire, le PN va sécréter des protéases telles que la métalloprotéase MMP-9, qui vont digérer la matrice et permettre de démasquer des sites d'adhérence reconnus spécifiquement par les  $\beta 2$  intégrines du PN.

### **A.I.3.3 Adhérence aux agents pathogènes et phagocytose**

Pour pouvoir éliminer sa cible par phagocytose, le PN doit d'abord pouvoir s'accoler à elle. Or, certains constituants du glycocalix des PN forment une barrière répulsive, car très négativement chargée, ce qui empêche les cellules circulantes de « s'agréger » entre-elles. C'est le cas notamment de la leucosialine (CD43), mucine membranaire comportant de nombreux branchements polysaccharidiques sialylés. Lors de l'activation des PN, une partie des molécules de leucosialine est éliminée par clivage protéolytique, diminuant ainsi la charge négative membranaire et son effet répulsif.

Ainsi, une fois atteint le foyer infectieux, des interactions se créent entre le PN et sa cible, par l'intermédiaire de récepteurs de reconnaissance de motifs à la surface des micro-organismes (comme le récepteur des  $\beta$ -glucans, polysaccharide de l'enveloppe bactérienne), mais également grâce à des facteurs extracellulaires, appelés opsonines, qui facilitent l'adhérence.

Il existe 2 types principaux d'opsonines :

- **des immunoglobulines de classe G**, dont l'agent à éliminer est recouvert, et qui sont spécifiquement reconnues par le PN grâce aux récepteurs pour le fragment Fc des Ig, Fc $\gamma$ R de type I, II ou III
- **des protéines du complément dérivées du C3**, après activation du complément par la voie alterne ou la voie classique. Les fractions C3b et C3bi fixées à la surface de la cible sont reconnues par les récepteurs CR1 (CD35), CR3 (qui n'est autre que l'intégrine CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18) à la surface du PN.



Cette étape d'adhérence est suivie de la phagocytose de l'agent pathogène opsonisé. Des pseudopodes vont entourer celui-ci et l'englober dans une vacuole, appelée phagosome, où seront déversés divers composants toxiques (provenant soit du contenu des granulations soit de l'activation de la NADPH oxydase membranaire) permettant la destruction finale de l'agent pathogène. La fusion du phagosome avec les granulations donne naissance à une vacuole dénommée phagolysosome. La phagocytose fait intervenir les intégrines leucocytaires CR3 et CR4 en collaboration avec les molécules de type FcγR.

#### **A.I.3.4 Activités « tueuses » et sécrétoires**

Afin d'éliminer l'agent pathogène, le PN a à sa disposition un véritable arsenal qui fait intervenir des mécanismes complexes et variés, classés en 2 catégories : dépendants et indépendants de l'oxygène (figure 4).

- **Les systèmes indépendants de l'oxygène** correspondent aux mécanismes de dégranulation aboutissant à la libération, dans le milieu extracellulaire et dans le phagolysosome de substances bactéricides. Ce sont des enzymes, principalement du lysosyme (qui dégrade les liaisons mucosidiques au niveau de la paroi bactérienne), des hydrolases acides, glycosidases, diverses protéases (voir contenu des granulations – figure 2). Interviennent également des protéines cationiques à activité antibiotique, tels que les défensines, les BPI et les serprocidines (sérine-protéases, comme l'élastase, la cathepsine G ou la protéinase 3).

La dégranulation se déroule dans un ordre précis, d'abord les vésicules sécrétoires, puis les gélatinases, puis les granulations spécifiques et enfin les grains azurophiles.

- **Les systèmes dépendants de l'oxygène** mettent en jeu la capacité d'activation métabolique des PN, aboutissant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). Cette propriété est désignée sous le terme d' « explosion respiratoire » (*respiratory burst*), qui n'a en aucun cas pour but de fournir de l'énergie à la cellule, mais de produire des composés oxydants doués d'un puissant effet microbicide.

La production de ces EROs est sous la responsabilité de la NADPH oxydase, complexe enzymatique multimoléculaire correspondant à une chaîne de transport d'électrons formée de plusieurs sous-unités membranaires et cytoplasmiques. La stimulation du PN provoque l'assemblage des différentes sous-unités, partagés entre cytosol et membrane. Les premiers métabolites formés lors de l'activation de la NADPH oxydase sont l'anion superoxyde ( $O_2^-$ )

et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), mais ils ne sont pas les plus efficaces dans la destruction des microorganismes. En effet, la puissance des mécanismes toxiques réside dans la formation d'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) à partir de  $H_2O_2$  et de chlore ( $Cl^-$ ) présent dans le cytoplasme, grâce à l'intervention de la myéloperoxydase, caractéristiques des granulations azurophiles et déversée dans le phagosome lors de la dégranulation. L'acide hypochloreux est l'espèce la plus toxique et la plus réactive formée par les PN : une grande majorité est convertie en chloramines, après interactions avec des dérivés aminés, mais d'autres interactions avec  $H_2O_2$  peuvent également donner naissance à d'autres oxydants de type singulet d'oxygène ( $^1O_2$ ).

La formation d'EROs se fait physiologiquement au contact de l'agent pathogène phagocyté ; cependant, produites en quantité excessive ou inappropriée dans le milieu extracellulaire, ces substances, de même que les enzymes contenues dans les granulations, peuvent participer à la survenue de dommages tissulaires au niveau du site inflammatoire et du PN lui-même.

A la suite de ces étapes, l'agent pathogène sera complètement détruit et « digéré » ; les PN vidés de leurs granulations mourront *in situ* en formant le pus, qui sera ensuite éliminé par les macrophages environnants.

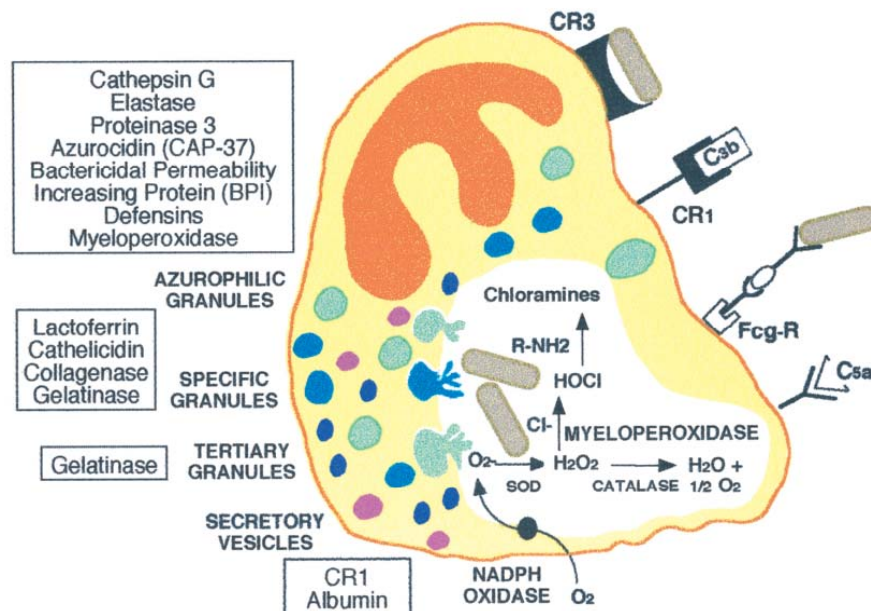


Figure 3.

Neutrophil effector mechanisms involved in the defense against pathogens and in the inflammatory process. Neutrophil effector systems are mobilized following phagocytosis of a pathogen. Complement opsonins C3b and C4b are recognized by CR1 and CR3. IgG opsonins are recognized via the immunoglobulin receptors (FcγR). The first microbicidal pathway is the oxidative response, which consists of the production of radical oxygen species following NADPH-oxidase complex activation, including superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and, via myeloperoxidase, hypochlorous acid ( $HOCl$ ) and chloramines. The second microbicidal pathway is non-oxygen-dependent and consists of the release in the phagolysosome or in the extracellular medium of preformed proteins stored in granules. Serine proteases, antibiotic proteins, as well as myeloperoxidase are contained in azurophilic granules. Metalloproteinases (collagenase and gelatinase) and antimicrobial proteins (lactoferrin and cathelicidin) are contained in specific granules. Gelatinase is also contained in tertiary granules, also called gelatinase granules. (Adapted from Witko-Sarsat and Descamps-Latscha, 1994.)

Figure 4 : Mécanismes effecteurs antimicrobiens du PN (d'après Witko-Sarsat, 2000)

#### **A.I.4- « Etats transitoires » du polynucléaire**

Le PN peut apparaître sous des formes intermédiaires entre l'état au repos et l'état activé ; ainsi qu'au retour entre l'état activé et l'état au repos ; ce sont respectivement le « priming » (ou amorçage) et la désensibilisation.

Le priming est un état important dans la physiologie et la réponse fonctionnelle du PN [van Eeden, 1999]. Celui-ci correspond au processus pour lequel la réponse cellulaire à un stimulus activateur est plus importante lorsque le PN a été préalablement exposé à des concentrations faibles, non-activatrices du même stimulus ou d'un autre. Le priming n'est pas associé à une réponse fonctionnelle mais à une série d'événements biochimiques intracellulaires préparant la future activation et permettant l'amplification de celle-ci. Par exemple, l'exposition des PN au lipopolysaccharide (LPS) n'induit pas l'explosion oxydative, mais potentialise fortement celle induite par d'autres agents, comme le fMLP ou le PAF [Downey, 1995].

A la suite d'une activation, les récepteurs cellulaires peuvent être transitoirement désensibilisés s'ils sont stimulés par un ligand (comme le fMLP par exemple). Les PN ne répondront alors plus à une stimulation ultérieure par le même ligand (désensibilisation homologue) ou même par un autre ligand (désensibilisation hétérologue) [van Eeden, 1999].

## Références

- Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 2007;28:340-5.
- Bouaouina M, Halbwachs-Mecarelli L. Activation des intégrines et adhérence des leucocytes et des plaquettes : Nouvelles données sur des voies de signalisation communes. *Hématologie.* 2006;12:21-33.
- Cowburn AS, Condliffe AM, Farahi N, Summers C, Chilvers ER. Advances in neutrophil biology: clinical implications. *Chest.* 2008;134:606-12.
- Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* 2008;112:935-45.
- Downey GP, Fukushima T, Fialkow L, Waddell TK. Intracellular signaling in neutrophil priming and activation. *Semin Cell Biol.* 1995;6:345-56.
- Gougerot-Pocidalo MA. Polynucléaires neutrophiles humains. *Revue Française des Laboratoires.* 2002;341:43-51.
- Liu L, Kubes P. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment: organ-specific mechanisms of action. *Thromb Haemost.* 2003;89:213-20.
- Seely AJ, Pascual JL, Christou NV. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care.* 2003;7:291-307.
- Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:197-223.
- van Eeden SF, Klut ME, Walker BA, Hogg JC. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods.* 1999;232:23-43.

- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000;80:617-53.

## A.II. Cathepsine G et élastase : physiologie

Dans l'objectif de ce travail visant à évaluer l'impact global des PN dans la coagulation, l'analyse bibliographique détaillée ci-après souligne l'implication potentielle de 2 enzymes contenues dans les granulations du neutrophile :

La cathepsine G (EC 3.4.21.20, abréviation Cath G) et l'élastase (EC 3.4.21.37, human neutrophil elastase, abréviation HNE) sont des glycoprotéines cationiques d'environ 30 kDa. Ce sont des enzymes appartenant à la famille de la chymotrypsine. La triade catalytique « sérine – histidine – acide aspartique » leur confère l'activité protéasique caractéristique des sérine-protéases (serprocidines) [Owen, 2008]. De ce fait, elles sont proches des facteurs de la coagulation, qui sont des zymogènes de sérine-protéases (FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII), et il n'est donc pas illégitime d'imaginer qu'elles aient un impact sur la génération de thrombine. Ces deux enzymes partagent bon nombre de caractéristiques communes (tableau 1).

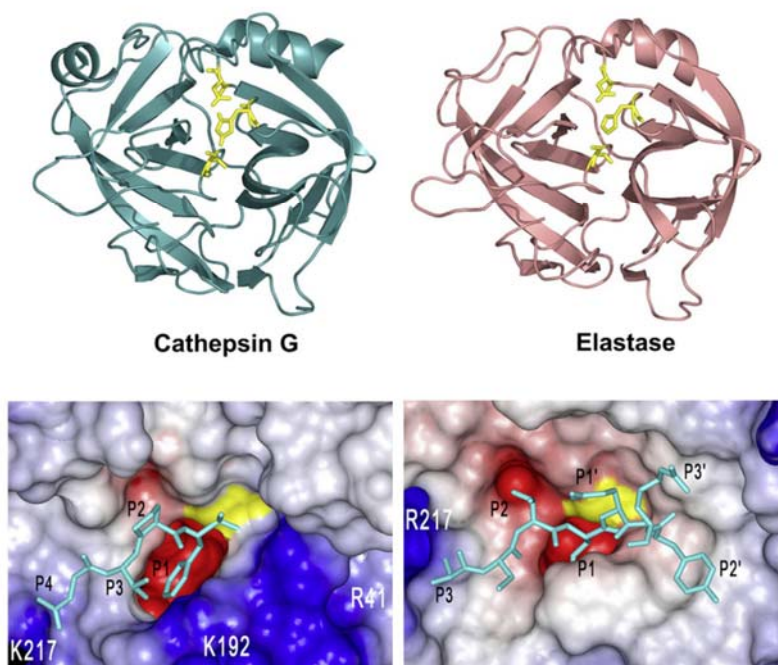
### A.II.1- Gènes, transcription et lieu de stockage intracellulaire

[Korkmaz, 2007]

Le gène de l'élastase, *ELA2*, est situé sur le bras court du chromosome 19, celui de la cathepsine G, *CTSG*, sur le bras long du chromosome 14. Ils sont tous deux composés de 5 exons et 4 introns, avec la particularité que chaque résidu de la triade catalytique est situé sur un exon différent (les résidus sont donc très largement séparés dans la structure primaire de la protéine, mais sont réunis dans le site actif de l'enzyme dans sa conformation tertiaire ; figure 5). Une forte activité de transcription de ces gènes est détectée au stade promyélocyte de la maturation du PN, qui correspond au stade de formation des granulations primaires azurophiles. L'activité de transcription va ensuite fortement réduire au cours de la maturation si bien qu'aucun ARNm n'est détectable au stade PN mature. Ceci explique que ces 2 enzymes ne sont présentes que dans les granulations primaires. Elles sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, qui nécessitent 2 clivages protéolytiques N-terminaux pour être actifs. Les enzymes seront ensuite stockées dans les granulations sous forme active. Aussi, malgré leur localisation chromosomique distincte, il semble que leur expression soit contrôlée au niveau transcriptionnel par des facteurs similaires, qui reconnaissent des motifs semblables dans les régions proximales du promoteur. Toutefois, ces enzymes ne sont pas caractéristiques

des PN, et on mesure de faibles concentrations en HNE ou en Cath G dans les monocytes par exemple.

Leurs caractéristiques physicochimiques principales sont résumées dans le tableau 1.



**Figure 5 : Structure tertiaire et organisation du site catalytique de la Cath G et de l'HNE, d'après Korkmaz, 2007**

### A.II.2- Localisation extracellulaire

L'exposition des PN à des stimuli cytokiniques ou chimioattractants induit une mobilisation rapide des granulations à la surface cellulaire, la libération de leur contenu, et donc l'apparition de Cath G ou d'HNE à la surface du PN mais aussi dans le milieu extracellulaire. Les mécanismes par lesquels les enzymes sont liés à la surface du PN ne sont pas entièrement connus, mais il semble qu'ils soient en relation avec des mécanismes électrostatiques, mettant en jeu des groupements sulfatés chargés négativement provenant des protéoglycannes membranaires (avec des séquences type héparane- ou chondroïtine-sulfate). Une fois libérées dans le milieu extracellulaire, les 2 sérine-protéases demeurent toujours actives, mais doivent faire face à de nombreux inhibiteurs plus ou moins spécifiques. Par exemple, en conditions normales, l' $\alpha$ 1-proteinase inhibitor et l'élafine antagonisent l'activité extracellulaire excessive de l'élastase. La protéine SLPI (secretory leukocyte protease

inhibitor) est aussi un puissant inhibiteur des 2 enzymes, mais avec une affinité élevée pour l'HNE. Le principal inhibiteur de la Cath G est l' $\alpha$ 1-antichymotrypsine (Tableau 1).

Néanmoins, plusieurs mécanismes leur permettent d'échapper à cette activité inhibitrice endogène [Pham, 2007]. Certaines études suggèrent que la concentration de ces enzymes dans les sites inflammatoires est telle que les systèmes inhibiteurs se révèlent insuffisants. De plus, l'acide hypochloreux produit parallèlement lors de l'activation des PN est capable d'inactiver divers inhibiteurs des protéases [Seely, 2003]. D'autres avancent l'hypothèse que les protéases libérées restent fixées à la membrane, ce qui les rend inaccessibles aux systèmes inhibiteurs de haut poids moléculaire. Cependant, Korkmaz a montré que l'élastase liée à la membrane est complètement inhibée par l' $\alpha$ 1-proteinase inhibitor quand les cellules sont en suspension, ce qui permet de penser que c'est la forte adhérence des PN avec leurs cibles qui permettrait une protection des protéases vis-à-vis de leurs inhibiteurs [Korkmaz, 2005].

**Tableau 1: Résumé des caractéristiques principales de l'HNE et de la Cath G**

|                                | <b>Elastase</b>                                                                                                    | <b>Cathepsine G</b>                                                                                                    |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Numéro EC</b>               | EC 3.4.21.37                                                                                                       | EC 3.4.21.20                                                                                                           |
| <b>Locus</b>                   | 19p13.3                                                                                                            | 14q11.2                                                                                                                |
| <b>Structure du gène</b>       | 5 exons, 4 introns                                                                                                 | 5 exons, 4 introns                                                                                                     |
| <b>Séquence « peptidique »</b> | 218 AA                                                                                                             | 235 AA                                                                                                                 |
| <b>Masse moléculaire (kDa)</b> | 29 – 30                                                                                                            | 28,5                                                                                                                   |
| <b>Sites de glycosylation</b>  | 2                                                                                                                  | 1                                                                                                                      |
| <b>pH optimal d'activité</b>   | 8,0 – 8,5                                                                                                          | 7,5 – 8                                                                                                                |
| <b>Site de clivage</b>         | Résidu hydrophobe en position P1 : Val, Cys, Ala, Met, Ile, Ser                                                    | Résidu aromatique ou chargé positivement en position P1 : Phe, Tyr, Lys, Arg                                           |
| <b>Localisation</b>            | Granulations azurophiles<br>Surface cellulaire du neutrophile après « priming »                                    | Granulations azurophiles<br>Surface cellulaire du neutrophile après « priming »                                        |
| <b>Inhibiteur endogène</b>     | $\alpha$ 1-proteinase inhibitor<br>$\alpha$ 1-antitrypsine<br>MNEI<br>Elafine<br>$\alpha$ 2-macroglobuline<br>SLPI | $\alpha$ 1-proteinase inhibitor<br>$\alpha$ 1-antichymotrypsin<br>MNEI<br>Elafine<br>$\alpha$ 2-macroglobuline<br>SLPI |



### A.II.3- Activités enzymatiques et fonctions biologiques

Il est classiquement admis que, puisque les granulations primaires (contrairement aux autres) subissent une exocytose limitée en réponse aux divers stimuli des PN, l'activité de ces 2 enzymes (détaillée ci-après) s'exerce majoritairement au niveau intracellulaire, lors de leur fusion avec le phagosome où elles ont un rôle majeur dans l'élimination des agents pathogènes phagocytés. Cependant, la constatation que leur activité optimale se situe à pH neutre alors que le pH du phagolysosome est largement acide, a amené à considérer d'autres rôles potentiels pour ces 2 enzymes.

#### A.II.3.1 Activité antibiotique ou microbicide

Ces 2 enzymes ont une action non négligeable dans l'élimination des agents pathogènes : bactéries, virus, champignons... et cette activité s'exerce aussi bien au niveau intracellulaire qu'extracellulaire.

L'élastase est capable de cliver les facteurs de virulence de plusieurs bactéries (*Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* ou *Yersinia enterocolitica*). Elle dégrade aussi la protéine Omp A (Outer membrane protein A) d'*Escherichia coli*, qui contribue à l'intégrité de la membrane externe de la bactérie.

L'activité de la cathepsine G est due quant à elle à au moins 3 séquences peptidiques distinctes du site actif.

Enfin, leur activité microbicide s'exerce également par l'intermédiaire d'un mécanisme de découverte récente (Brinkmann, 2004), appelé NETs (neutrophils extracellular trap) et qui correspond à un réseau complexe de chromatine dérivée des PN associée à diverses protéines issues des granulations (et notamment l'élastase) permettant de piéger et de tuer les bactéries Gram positives comme négatives.

#### A.II.3.2 Activité protéasique

Leur spectre d'activité est étendu. L'élastase a une activité trypsine-like et possède une spécificité large incluant l'élastine et de nombreuses autres protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine, collagènes et protéoglycannes) [Korkmaz, 2007]. La cathepsine G a une spécificité différente chymotrypsine- et trypsine-like, mais avec une activité catalytique plus faible que l'élastase.

Les conséquences de ces activités protéasiques sont multiples sur leurs rôles biologiques, hors activité bactéricide détaillée précédemment :

En premier lieu, elles sont impliquées dans la dégradation et le remodelage de la matrice extra-cellulaire au niveau du site de recrutement des PN. Mais elles ont également un rôle important dans les phénomènes inflammatoires car elles sont responsables du clivage de bon nombre de médiateurs, récepteurs ou cytokines (tableau 2). En effet, elles modifient l'activité de plusieurs chémokines et fournissent un mécanisme alternatif de conversion des précurseurs cytokiniques en forme active ; cependant les données restent encore controversées pour déterminer si ces clivages activent ou inactivent les substrats. Ces sérines-protéases granulocytaires pourraient donc réguler finement la réponse inflammatoire locale en modulant l'activité biologique des chemokines et cytokines par protéolyse limitée [Pham, 2007 ; Wiedow & Meyer-Hoffert, 2005].

Elles interviennent ensuite dans la régulation des facteurs de croissance ; c'est principalement le cas de l'HNE, qui est capable d'activer l'EGFR (epidermal growth factor receptor), par l'intermédiaire de l'activation du TGF- $\alpha$  lié aux surfaces cellulaires. De ce fait, l'HNE est considérée comme un important stimulus de la prolifération épidermique, notamment dans le psoriasis. De plus, la stimulation de l'EGFR est une composante majeure de l'hypersécrétion du mucus rencontrée dans les maladies pulmonaires inflammatoires chroniques.

Ces enzymes interviennent également dans l'activation ou le clivage de plusieurs récepteurs de surface et permettent donc de réguler l'activité gouvernée par ceux-ci. Par exemple, la cathepsine G est connue pour activer PAR-4 (protease-activated receptor), récepteur à 7 domaines trans-membranaires, exprimé à la surface de plusieurs types cellulaires (plaquettes, fibroblastes...), alors qu'elle (tout comme l'HNE) est capable d'inactiver PAR-1. Or les PAR sont connus pour intervenir dans la modulation des phénomènes inflammatoires.

Enfin, la Cath G semble activer les lymphocytes et moduler la réponse humorale antigène-spécifique chez la souris, et donc peut jouer un rôle d'adjuvant dans la modulation de la réponse immunitaire.

**Tableau 2 : Activités biologiques potentielles de Cath G et HNE (hors activité antibiotique), d'après Pham, 2007**

| <b>Cibles</b>                    | <b>Protéase</b> | <b>Conséquences biologiques potentielles</b>                                        |
|----------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Chémokines</b>                |                 |                                                                                     |
| CCL3                             | Cath G, HNE     | Abrogation de l'activité chimiotactique                                             |
| CCL5                             | Cath G          | Troncature N-terminale et ↓ activité chimiotactique                                 |
| CCL15                            | Cath G          | Troncature N-terminale et ↑ activité chimiotactique                                 |
| CXCL12                           | Cath G, HNE     | Abrogation de l'activité chimiotactique                                             |
| <b>Cytokines</b>                 |                 |                                                                                     |
| IL-6                             | Cath G, HNE     | Dégradation et inactivation                                                         |
| IL-18                            | HNE             | Protéolyse et abrogation de l'activité                                              |
| TNF- $\alpha$                    | Cath G, HNE     | Activation du TNF- $\alpha$ membranaire ; dégradation                               |
| <b>Facteurs de croissance</b>    |                 |                                                                                     |
| TGF- $\beta$                     | HNE             | Libération du TGF- $\beta$ membranaire pour activer le EGFR                         |
| <b>Récepteurs</b>                |                 |                                                                                     |
| $\alpha$ II $\beta$ 3 intégrines | HNE             | ↑ agrégation plaquettaire                                                           |
| CD14                             | Cath G, HNE     | ↓ activation cellulaire induite par le LPS                                          |
| CD43                             | HNE             | ↑ migration cellulaire                                                              |
| IL6-R                            | Cath G          | Induction de translocation de PKC $\zeta$ , de flux calciques et du chimiotactisme. |
| PAR1                             | Cath G, HNE     | Inactivation                                                                        |
| PAR2                             | Cath G, HNE     | Activation et inactivation du récepteur à travers des sites de clivage distincts    |
| PAR4                             | Cath G          | Activation                                                                          |
| <b>Molécules d'adhérence</b>     |                 |                                                                                     |
| E-cadhérines                     | Cath G, HNE     | ↑ transmigration du neutrophile                                                     |
| ICAM-1                           | Cath G, HNE     | ↑ infiltration du neutrophile                                                       |
| VCAM-1                           | Cath G, HNE     | ↑ mobilisation des cellules hématopoïétiques                                        |
| <b>Apoptose</b>                  |                 |                                                                                     |
| NF- $\kappa$ B                   | HNE             | Induction de l'apoptose                                                             |

## **Références**

- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303:1532-5.
- Korkmaz B, Attucci S, Jourdan ML, Juliano L, Gauthier F. Inhibition of neutrophil elastase by alpha1-protease inhibitor at the surface of human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol*. 2005;175:3329-38.
- Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*. 2008;90:227-42.
- Owen CA. Leukocyte cell surface proteinases: regulation of expression, functions, and mechanisms of surface localization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:1246-72.
- Pham CT. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:1317-33.
- Seely AJ, Pascual JL, Christou NV. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care*. 2003;7:291-307.
- Wiedow O, Meyer-Hoffert U. Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. *J Intern Med*. 2005;257:319-28.

### **A.III. Hémostase et coagulation** [Xi, 1989 ; Butenas, 2002 ; Hoffmann, 2003 ; Monroe, 2006]

L'hémostase d'une part protège contre le saignement en évitant qu'une trop importante quantité de sang quitte le lit vasculaire après survenue d'une brèche et permet d'autre part la bonne circulation du flux sanguin en empêchant la formation de caillots obstruant les vaisseaux. Elle survient en réponse à un dommage vasculaire (coupure...) ou à une activation de l'endothélium (par des cytokines ou des stimuli inflammatoires). C'est un phénomène localisé et non extensif, de par la présence de systèmes de régulation extrêmement fins. On distingue classiquement 3 phases :

***L'hémostase primaire***, étape où l'adhérence entre plaquettes et structures sous-endothéliales est primordiale et aboutit à la formation du clou plaquettaire.

***La coagulation***, aboutissant à la génération de thrombine permettant la formation de fibrine.

***La fibrinolyse***, dont le but est d'éviter l'extension excessive du caillot de fibrine formé et d'assurer son élimination.

#### **A.III.1- Déroulement de la coagulation**

Nous avons choisi de détailler plus particulièrement dans ce travail l'étape de la coagulation. Celle-ci a pour expression le passage du sang de l'état liquide à l'état de gel, par transformation d'une protéine plasmatique soluble, le fibrinogène, en une protéine insoluble, la fibrine, qui s'organise en réseau pour former un caillot. Elle consiste en une suite de réactions enzymatiques aboutissant à la génération de thrombine, enzyme-clé du système, permettant la conversion du fibrinogène soluble en fibrine insoluble, qui permet de consolider le clou plaquettaire formé lors de l'hémostase primaire.

Le bon déroulement de la coagulation nécessite la présence de surfaces cellulaires ainsi que de calcium et se découpe en plusieurs étapes (figure 6).

##### **A.III.1.1 Initiation**

La coagulation est initiée par le contact du facteur tissulaire (FT) avec le sang circulant. Le FT est une glycoprotéine transmembranaire constituée de 3 domaines : un

domaine extracellulaire qui fixe la facteur VIIa de façon très affine, un domaine d'ancrage transmembranaire et une queue intracytoplasmique, responsable de la transduction des signaux intracellulaires [de Prost et al, 2006]. L'interaction du FT avec le FVIIa (une sérine-protéase dont il est le récepteur et le cofacteur) augmente d'environ  $2 \times 10^7$  fois l'activité enzymatique du FVIIa vis-à-vis de ces substrats (FX et FIX, cf ci-dessous). Le FT est exprimé de façon constitutive par différents types cellulaires, de localisation vasculaire (fibroblastes de l'adventice) et extravasculaire (cellules épithéliales) ; Les cellules en contact direct avec le sang n'exprime pas le FT dans les conditions physiologiques, mais peuvent être amenées à la faire lors d'un sepsis ou de pathologies malignes. A la suite d'une brèche vasculaire, le FT va se lier au FVIIa, présent en très faible quantité dans le plasma (inférieure au nM), pour former un complexe nommé tenase extrinsèque. Ce complexe va catalyser la conversion du facteur X en Xa et du facteur IX en IXa. Le facteur Xa va ensuite s'associer, à la surface des cellules exposant le FT, au facteur Va (notamment libéré par les plaquettes suite à leur adhérence au collagène sous-endothélial). Ce complexe Xa-Va en présence de phospholipides anioniques (fournis par les surfaces cellulaires) et de  $\text{Ca}^{2+}$  va former la prothrombinase, capable de cliver la prothrombine (facteur II) en thrombine active (facteur IIa).

#### **A.III.1.2 Amplification**

Les premières traces de thrombine (de l'ordre de quelques pM) générées à la surface des cellules portant le FT vont avoir plusieurs fonctions. La principale est d'activer les plaquettes, aboutissant à l'exposition membranaire de phospholipides procoagulants et à la libération entre autres de facteur V. La thrombine générée va également activer les facteurs V, VIII et XI à la surface des plaquettes. La thrombine va donc amplifier sa propre génération.

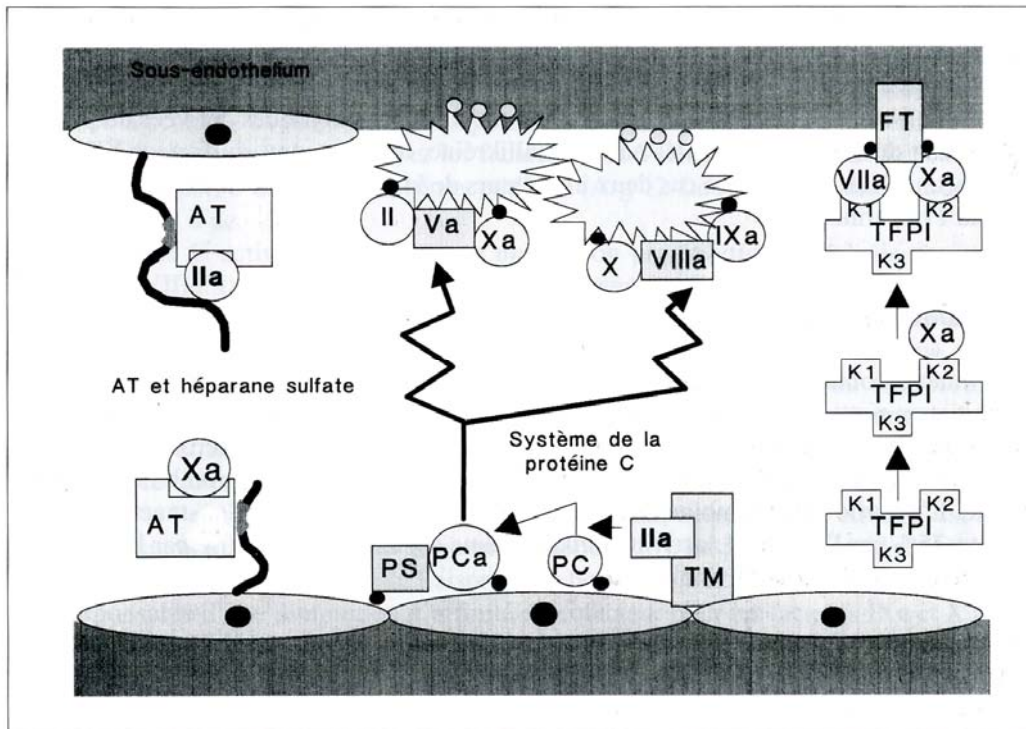
#### **A.III.1.3 Propagation**

A la surface des plaquettes activées et en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , le facteur IXa va s'associer au facteur VIIIa pour former la tenase intrinsèque, également capable de cliver le facteur X en Xa, facteur Xa qui va immédiatement se complexer au facteur Va pour former le complexe prothrombinase provoquant une génération explosive de thrombine. La thrombine va cliver le fibrinogène en fibrine. Le facteur IXa peut être produit soit par la tenase extrinsèque à la surface des cellules portant le FT (auquel cas, il devra migrer en phase fluide vers la surface plaquettaire), soit par le facteur XIa directement à la surface des plaquettes. Cette boucle d'amplification de la formation du Xa est nommée « Boucle de Josso ». Enfin, la fibrine,



### A.III.2- Régulation de la coagulation

Afin d'éviter l'extension et la propagation du caillot à distance du site lésé, le système de la coagulation est finement régulé par des inhibiteurs, capables d'inactiver rapidement les facteurs générés *in situ*. L'antithrombine et le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) sont les principaux inhibiteurs dits « stoechiométriques » et le système Protéine C/Protéine S/Thrombomoduline est un inhibiteur dynamique de la génération de thrombine (figure 7).



**Figure 7 : Principaux inhibiteurs de la coagulation (d'après Aiach, 1995 ; Guillin, 1995).**

### A.III.2.1 Antithrombine (AT)

C'est une serpine monocaténaire synthétisée par le foie possédant un site réactif et un site permettant de fixer des glycosaminoglycanes (GAG). Sa concentration plasmatique est d'environ 150 µg/mL et sa demi-vie plasmatique de 3 jours [Rau, 2007]. L'AT est le principal inhibiteur de la thrombine (75%), mais elle est également capable d'inhiber les facteurs Xa et dans une moindre mesure les facteurs IXa, XIa et XIIa. L'AT forme un complexe équimoléculaire irréversible avec ces facteurs, complexe dans lequel ceux-ci n'ont plus d'activité. Cette activité inhibitrice, initialement lente, est considérablement accélérée par la présence de glycosaminoglycanes (comme l'héparane sulfate présent sur la paroi vasculaire



ou encore les dérivés hépariniques - cf figure 7). Il faut enfin noter que l'AT n'a pas d'activité sur la thrombine liée à la fibrine [Rau, 2007]. L'AT est la cible de certains anticoagulants comme l'héparine (standard ou non fractionnée), les héparines de bas poids moléculaires ou le fondaparinux.

#### **A.III.2.2 Système de la protéine C / protéine S / thrombomoduline** [Guillin, 1995 ; Vincenot, 1997]

La protéine C (PC) et la protéine S (PS) sont des protéines dont la synthèse hépatique dépend de la vitamine K (au même titre que les facteurs II, VII, IX et X). La thrombomoduline (TM) est une protéine transmembranaire, localisée à la surface des cellules endothéliales.

La thrombine va former un complexe équimoléculaire de très haute affinité avec la TM endothéliale, au sein duquel elle va perdre sa capacité à cliver le fibrinogène, à activer les plaquettes et les facteurs V et VIII. Ce complexe va pouvoir cliver la PC, inactive, en PCa après fixation de celle-ci sur son récepteur cellulaire EPCR (endothelial protein C receptor) [Griffin, 2007]. Ainsi, en présence de PS libre, la PCa pourra inhiber les facteurs Va et VIIIa (en facteur Vi et VIIIi respectivement) à la surface des plaquettes activées, diminuant la vitesse de génération de thrombine.

#### **A.III.2.3 TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor)** [Crawley, 2008]

C'est un inhibiteur de type Kunitz, sécrété dans le plasma par les cellules endothéliales et circulant en partie lié aux lipoprotéines. Pour exercer son activité, il doit se former un complexe quaternaire Xa-TFPI-VIIa-FT, dans lequel les facteurs Xa, VIIa et FT n'ont plus d'activité. L'inhibition du complexe FT-VIIa par le TFPI n'est possible qu'à partir du moment où des traces de facteur Xa ont été générées. Le TFPI est en conséquence un inhibiteur majeur de la phase d'initiation alors que l'AT et le système PC/PS/TM ont des actions inhibitrices majoritairement sur la phase de propagation.

#### **A.III.2.4 Autres inhibiteurs de la coagulation** [Guillin, 1995 ; Rau, 2007]

##### **A.III.2.41 L' $\alpha$ 2-macroglobuline ( $\alpha$ 2M)**

L' $\alpha$ 2-macroglobuline est une glycoprotéine synthétisée par la cellule endothéliale, et présente dans le plasma. Elle forme des complexes avec les endopeptidases (telles que trypsine, chymotrypsine, pepsine...) de toutes les classes catalytiques connues ; les enzymes

complexées sont englobées par l'inhibiteur et deviennent incapables d'exercer leur action vis-à-vis de leur(s) substrat(s) macromoléculaire(s). Parmi les protéases de la coagulation, l' $\alpha$ 2-macroglobuline inhibe la thrombine et la kallicréine. Elle représente 25% de la capacité inhibitrice du plasma vis-à-vis de la thrombine.

#### ***A.III.2.42 Le second cofacteur de l'héparine (HCII)***

Comme l'antithrombine, il appartient à la famille de serpins et forme un complexe équimoléculaire avec l'enzyme à inhiber. Sa synthèse est hépatique. Le HCII est un inhibiteur lent de la thrombine, dont l'activité est augmentée en présence d'héparine ou de dermatane sulfate (GAG présent dans la matrice extracellulaire). Contrairement à l'AT, le HCII est capable d'inhiber la thrombine en phase fluide ainsi que la thrombine liée au caillot. Son retentissement sur la coagulation *in vivo* apparaît comme faible, puisqu'un déficit ne constitue pas un risque de thrombose.

#### ***A.III.2.43 L' $\alpha$ 1-antitrypsine***

C'est une autre serpine plasmatique à large spectre, agissant surtout au niveau tissulaire en inhibant des protéases leucocytaires, des enzymes pancréatiques, la collagénase... et concernant les protéines de la coagulation, elle est capable d'inactiver la thrombine, la kallicréine et le facteur XIa, mais de façon très lente, pour un retentissement *in vivo* non significatif.

## **Références**

- Aiach M, Alhenc-Gelas M. Déficits en inhibiteurs de la coagulation. In: Sampol J, Arnoux D, Boutiere B, eds. Manuel d'hémostase. Paris: Elsevier, 1995:147-163.
- Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67:3-12
- Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:233-42.
- De Prost D, Moatti D, Petit L, Ollivier V. L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), molécule clé de défense contre la thrombose. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1999;11: 548-554.
- Griffin JH, Fernandez JA, Gale AJ, Mosnier LO. Activated protein C. *J Thromb Haemost* 2007;5:73-80.
- Guillin M, Bezeaud A. Physiologie de la coagulation. In: Sampol J, Arnoux D, Boutiere B, eds. Manuel d'hémostase. Paris: Elsevier, 1995:147-163.
- Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* 2003;17 Suppl 1:S1-5.
- Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:41-8.
- Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2007;5:102-15.
- Vincenot A, Gaussem P. Physiologie et régulation cellulaire du système de la protéine C. *Ann Biol Clin (Paris)* 1997;55:17-24.
- Xi M, Béguin S, Hemker HC. Importance of factor-IX-dependent prothrombinase formation--the Josso pathway--in clotting plasma. *Haemostasis.* 1989;19:301-8.

## **A.IV. Polynucléaires neutrophiles et coagulation**

### **A.IV.1- Facteur tissulaire et polynucléaires neutrophiles**

Dès lors que la présence de leucocytes (et plus particulièrement des PN) dans les caillots a été admise (voir préambule), plusieurs questions se sont dégagées afin d'établir l'objet de ce recrutement.

En premier lieu qu'en est-il d'une activité « thromboplastine » ou facteur tissulaire d'origine granulocytaire ?

Dans les années 1960, Niemetz et son équipe ont exploré cette activité facteur tissulaire en isolant les leucocytes issus de donneurs sains, de patients atteints d'hémopathie et chez le lapin [Niemetz, 1972 ; Garg, 1973 ; Niemetz, 1973]. Des tests de recalcification et/ou d'activité thromboplastine ont été réalisés en mélangeant plasma pauvre en plaquettes citraté et suspensions de leucocytes, en présence ou non d'endotoxine (ou LPS). Dans ces conditions, une activité procoagulante (thromboplastine-like) non négligeable a été détectée. Cependant, la nature des leucocytes isolés dans les suspensions testées n'est pas claire et il semble qu'elles n'aient pas un niveau de pureté suffisant. D'ailleurs, les auteurs ont conclu empiriquement que l'activité procoagulante observée est due aux polynucléaires, étant donné qu'ils constituent la population cellulaire la plus abondante. Or, la présence de monocytes rend difficile l'interprétation des données car les monocytes sont maintenant clairement connus pour exprimer de façon constitutive le FT, et notamment après stimulation par le LPS. Cette notion demeure en revanche encore floue en ce qui concerne les PN.

Hair, en 1996, a repris l'étude de l'activité procoagulante de cellules en culture (polynucléaires ; monocytes/macrophages issus de donneurs sains) et de cellules HL-60, qui seront ultérieurement différenciées soit vers la lignée granuleuse, soit vers la lignée monocyte/macrophage. Une attention particulière a été portée sur la pureté des suspensions cellulaires utilisées. Les données obtenues font état d'une absence d'antigène FT, d'activité FT et d'ARNm FT dans les PN matures même après stimulation par le LPS. En revanche, l'antigène FT a été détecté chez les monocytes matures et les cellules HL-60 indifférenciées, et ce, à un faible niveau, aboutissant à une faible activité procoagulante. Mais, une fois stimulées, ils notent dans ces populations cellulaires une forte augmentation de l'activité procoagulante associée à une augmentation de l'antigène FT. Aussi cette étude souligne que,

dans une suspension de PN, une contamination monocyttaire au-delà de 3% peut rendre délicate l'interprétation des activités procoagulantes. Il est enfin intéressant de noter la discordance entre la présence de FT antigène dans les cellules indifférenciées et sa disparition chez les cellules granuleuses matures, ce qui permet de penser que l'expression du FT pourrait être dépendant du degré de maturation [Hair, 1996].

En 1999, Giesen a publié des travaux majeurs sur la perception et le concept de FT quant à son origine. En effet, pendant plusieurs années, il était admis que le faible niveau d'antigène FT parfois détecté dans le sang circulant était insignifiant et non associé à du FT fonctionnel. Cette étude, dans un système de circulation de sang (issus de volontaires sains) sur des lames coatées par du collagène ou des média artérielles d'origine porcine, a montré clairement que le FT circulant mesuré était soit actif, soit qu'il pouvait le devenir ; ceci a donné naissance au concept de *blood-borne tissue factor*. Par des techniques d'immunomarquage, les auteurs ont émis l'hypothèse que les leucocytes pouvaient être la principale source de FT dans le sang du fait de la mise en évidence de monocytes FT + et surtout de neutrophiles FT + [Giesen, 1999]. Cependant, les auteurs n'ont pas pu statuer sur l'origine du FT dans les neutrophiles : est-ce parce qu'ils le synthétisent eux-mêmes ou est-ce parce qu'ils le « récupèrent » et le transportent ensuite sur le lieu du thrombus ? Cette question est le noeud du problème.

Osterud et son équipe, depuis le début des années 2000, ne croient pas en la capacité des PN à synthétiser *de novo* ou à exprimer constitutivement le FT. Selon leurs travaux [Osterud, 2000], les granulocytes n'expriment pas le FT en présence d'agonistes tels que le LPS ou le PMA. Les faibles traces détectées sont selon eux le simple fait d'une contamination d'origine monocyttaire. Cette thèse est d'ailleurs étayée par le fait qu'en réduisant les interactions monocytes / PN par l'EDTA (qui modifie les flux calciques et diminue la liaison de la P-sélectine), les niveaux de FT dans les PN sont plus bas encore. Le niveau d'antigène FT semble même corrélé à la contamination monocyttaire. Aussi, Osterud avance, sur la base de résultats non publiés, que dès l'instant que des microparticules (nous détaillerons le concept dans la partie suivante) riches en FT sont exposées à des PN, celles-ci s'y lient immédiatement. Cependant, les conditions expérimentales de cette étude apparaissent surprenantes car les temps de stimulation des cellules sont très longs (jusqu'à 24h) par rapport à la durée de vie des PN. De plus seul l'antigène FT a été recherché, pas l'activité procoagulante.

Toutefois, Nemerson en réponse à cette étude, imagine que les conditions expérimentales sont extrêmement importantes et peut-être à l'origine des données discordances [Nemerson, 2000].

En effet, contrairement au cas des monocytes, il existe peu de données sur les conditions optimales d'étude de l'expression/induction de FT chez les granulocytes. Par exemple, il semble que la présence de PAF ou d'ICAM-1 soit un pré-requis pour l'expression de FT *in vivo* mais cela n'a pas pu être reproduit *in vitro* [Nakamura, 2004].

D'ailleurs, Imamura a montré dans un modèle de réaction de Arthus que la plupart des leucocytes accumulés sur le site inflammatoire sont FT + et que la majorité sont des PN. Mais surtout, par hybridation *in situ*, ils mettent en évidence de l'ARNm FT dans les neutrophiles, indiquant clairement une synthèse *de novo* de FT par ceux-ci [Imamura, 2002]. Enfin, ce FT est fonctionnel, comme le démontre un test de liaison au FVIIa. La publication de ces résultats a relancé intensivement le débat, mais n'a pas permis de trancher [Nakamura, 2004 ; Osterud, 2004].

En 2006, Maugeri a publié des résultats spectaculaires. En utilisant des stimuli plus proches de la physiologie, P-sélectine et fMLP et en réduisant la durée d'incubation pour être plus proche de la durée de vie des PN, ils montrent que des PN lavés issus de donneurs sains (monocytes < 0,02% ; Ø plaquettes) ont, après stimulation, une activité procoagulante (déterminée par des temps de recalcification et des temps de céphaline + activateur) et surtout que cette activité est abolie en présence d'un Ac anti-FT ou de facteur VII inactivé. La stimulation induit en parallèle un changement de localisation intracellulaire du FT, passant du cytoplasme à la surface ; toutefois il faut mentionner que les niveaux de significativité obtenus l'ont été à l'aide d'un test statistique inapproprié (ANOVA/test de Dunett), car c'est un test paramétrique alors que les échantillons sont de faibles effectifs (N=3 ou 6). En revanche de façon plus convaincante, par RT-PCR, une faible quantité d'ARNm FT a été détectée dans les cellules au repos, et celle-ci augmente de 3 à 5 fois après stimulation (incubation = 1h) par la P-sélectine ou le fMLP respectivement. Ces données indiquent que la stimulation par ces agonistes induit d'une part le transport de FT préexistant dans le cytoplasme du PN à sa surface, mais d'autre part la transcription et la production de FT *de novo* [Maugeri, 2006].

Dernièrement l'équipe d'Osterud a publié des données obtenues à l'aide de méthodologie très pointues [Egorina, 2008]. Tout d'abord, à partir de populations leucocytaires extrêmement bien purifiées : séparation sur gradient de densité suivie d'une immunopurification par Ac spécifiques, ils exposent que les PN stimulés ou non par une large batterie d'agonistes (LPS + PMA pendant 2h ; P-sélectine pendant 1h ; GM-CSF + PAF pendant 25 min) n'expriment pratiquement pas le FT. Surtout, ils montrent qu'en inhibant l'expression monocyttaire de FT à l'aide d'un ARN interférent, ils diminuent les déjà faibles niveaux de FT détectés dans les

granulocytes, ce qui suggère un transfert actif de FT des monocytes vers les PN. Cette hypothèse est prouvée par l'induction de la surexpression d'une protéine de fusion FT/YFP (yellow fluorescent protein) par les monocytes transfectés. En effet, ils observent une accumulation de la protéine de fusion dans la fraction granulocytaire après stimulation des monocytes transfectés. Donc les granulocytes, dans ces conditions, ont acquis le FT exprimé par les monocytes.

Toutes ces données concernant le FT granulocytaire sont difficiles à intégrer ensemble, car, même si les études sont toutes bien construites, aucune n'utilise strictement les mêmes conditions de stimulation des cellules ; par exemple, Osterud stimule pendant 1 ou 2 heures avec le LPS ou le PMA. Maugeri, avec le fMLP et la P-sélectine pendant quelques minutes seulement. De plus il faut souligner que le PMA est un agoniste « pharmacologique » (analogue du diacylglycérol, activant la NADPH oxydase), par conséquent assez éloigné de la physiologie. De même le LPS, s'il est l'agoniste de référence pour l'étude des monocytes, se révèle moins approprié à l'étude des PN car ces derniers expriment beaucoup moins TLR4 (récepteur du LPS) par rapport aux monocytes. Il est possible également que dans les conditions d'Osterud, le FT soit bel et bien exprimé par les PN mais que, comme l'incubation est prolongée, celui-ci soit dégradé par les nombreuses enzymes libérées par les PN stimulés.

La question de l'expression et de l'origine du FT granulocytaire reste donc encore ouverte...



## MEMO

*L'hypothèse du facteur tissulaire d'origine granulocytaire fait largement débat :*

*La notion de « blood-borne tissue factor » avait relancé le concept d'expression du facteur tissulaire par le PN.*

*Toutefois des données suggèrent que les PN sont plus capables de capter le FT environnant (et en particulier monocytaire) que de l'exprimer constitutivement. Malgré cela il semble que les PN soient capables d'activer la transcription du gène codant pour celui-ci et donc de le produire et l'exprimer dans des conditions particulières qui restent à clairement préciser.*





## **Références**

- Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Østerud B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood*. 2008;111:1208-16.
  
- Garg SK, Niemetz J. Tissue factor activity of normal and leukemic cells. *Blood*. 1973;42:729-35.
  
- Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:2311-5.
  
- Hair GA, Padula S, Zeff R, Schmeizl M, Contrino J, Kreutzer DL, de Moerloose P, Boyd AW, Stanley I, Burgess AW, Rickles FR. Tissue factor expression in human leukemic cells. *Leuk Res*. 1996;20:1-11.
  
- Imamura T, Kaneda H, Nakamura S. New functions of neutrophils in the arthus reaction: expression of tissue factor, the clotting initiator, and fibrinolysis by elastase. *Lab Invest*. 2002;82:1287-95.
  
- Maugeri N, Brambilla M, Camera M, Carbone A, Tremoli E, Donati MB, de Gaetano G, Cerletti C. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost*. 2006;4:1323-30.
  
- Nakamura S, Imamura T, Okamoto K. Tissue factor in neutrophils: yes. *J Thromb Haemost*. 2004;2:214-7.
  
- Nemerson Y. Tissue factor in neutrophils. *Thromb Haemost*. 2000;83:802.
  
- Niemetz J. Coagulant activity of leukocytes. Tissue factor activity. *J Clin Invest*. 1972;51:307-13.
  
- Niemetz J, Fani K. Thrombogenic activity of leukocytes. *Blood*. 1973;42:47-59.

- Osterud B, Rao LV, Olsen JO. Induction of tissue factor expression in whole blood: lack of evidence for the presence of tissue factor expression in granulocytes. *Thromb Haemost.* 2000;83:861-7.
- Osterud B. Tissue factor in neutrophils: no. *J Thromb Haemost.* 2004;2:218-20.
- Tallman MS. Deciphering the pathogenesis of coagulation dysfunction in leukemia. *Leuk Res.* 1996;20:13-6.

## **A.IV.2- Les polynucléaires neutrophiles : support membranaire de la coagulation et/ou surface propice à la coagulation ?**

La coagulation nécessite la présence de surfaces phospholipidiques, fournies dans les conditions normales par les cellules impliquées dans la génération de thrombine : cellules porteuses du facteur tissulaire et plaquettes. Pour permettre l'assemblage des complexes protéiques en présence de calcium, ces phospholipides doivent être chargés négativement, comme le sont par exemple la phosphatidyléthanolamine ou surtout la phosphatidylsérine. Ce type de phospholipides anioniques (PLa) est classiquement situé dans le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules et par conséquent pas directement au contact du sang et des facteurs de coagulation [Bruckheimer, 1996]. Par un mécanisme de flip-flop, survenant en général après activation cellulaire, ces PLa sont transférés dans le feuillet externe de la membrane et donc susceptibles d'accueillir les complexes de la coagulation : tenase extrinsèque ou intrinsèque, et prothrombinase.

Des PLa sont aussi présents dans les microparticules MP (ou microvésicules) issues de toutes sortes de cellules en conditions normales ou pathologiques [Morel, 2007 ; Freyssinet, 2003]. En effet, les MP sont des fragments de membranes libérés quasi spontanément par potentiellement n'importe quel type de cellules soumises à un stress (attaque du complément, stimulation ...), y compris pendant l'apoptose [Freyssinet, 2003]. Mais surtout, la libération de MP fait suite à un remodelage de la membrane dans lequel l'asymétrie des feuillets est perdue. Le sang contenant des MP contient par conséquent des PLa procoagulants.

Les PN peuvent-ils constituer une surface cellulaire propice à l'assemblage des complexes de la coagulation ? Cette question est récurrente et encore sujet à controverse...

En 1985, l'équipe de Mann a étudié l'activité prothrombinase sur des surfaces naturelles : plaquettes (activées par la thrombine) et sous-populations leucocytaires au repos (monocytes, lymphocytes et polynucléaires) [Tracy, 1985]. Les paramètres de génération de thrombine sont étudiés dans un système reconstitué contenant FXa, FVa et calcium ; les PLa étant potentiellement apportés par les cellules testées. Selon ces données, la prothrombinase peut s'assembler et être fonctionnelle sur les 4 types de cellules testés. Les différentes cellules font état d'un nombre variable de sites pour la prothrombinase et de façon surprenante, ce sont les lymphocytes, réputés pour être silencieux lors de la coagulation [Bouchard, 2003],

qui possèdent le plus grand nombre de sites de liaison pour les facteurs Xa et Va. Toutefois, l'efficacité catalytique de la surface des lymphocytes apparaît médiocre comparativement à celle des plaquettes. Concernant les PN, dans ces conditions, la prothrombinase peut également s'assembler à leur surface avec une efficacité catalytique proche de celle des plaquettes activées par la thrombine et des monocytes. De façon inattendue, les PN exprimeraient plus de sites par cellules que les plaquettes (tableau 3).

**Tableau 3 : Nombre de sites et efficacité catalytique d'assemblage de la prothrombinase à la surface de différentes cellules sanguines (d'après Bouchard, 2003)**

|              | Nombre de sites de<br>liaison par cellule | $k_{cat}$<br>( $s^{-1}$ ) |
|--------------|-------------------------------------------|---------------------------|
| Monocytes    | 16000                                     | 34                        |
| Neutrophiles | 8000                                      | 28                        |
| Lymphocytes  | 45000                                     | 8                         |
| Plaquettes   | 2700                                      | 35                        |

L'assemblage des tenases extrinsèque (FT/VIIa) et intrinsèque (VIIIa/IXa) à la surface des leucocytes a été étudié [MacGee & Li, 1991]. Dans un système cellulaire de mesure chromogénique (conversion du substrat S2222 par le FXa généré), seuls les monocytes humains ont exprimé des sites pour l'assemblage des deux complexes. Les PN ne sont donc capables d'assembler ni l'un ni l'autre à leur surface. En ce qui concerne la tenase extrinsèque, ces résultats ne sont pas étonnants, car son assemblage est dépendant de la présence de FT à la surface des cellules. Or les PN n'ayant pas été stimulés, il apparaît donc peu probable qu'elles fixent le VIIa par expression de FT (comme discuté précédemment).

Ces études montrent que le PN ne représentent pas une surface cellulaire suffisante pour avoir un retentissement sur la génération de thrombine, par accélération de la formation de FXa, mais peuvent potentiellement générer de la thrombine par assemblage de la prothrombinase à leur surface. Cependant, il faut mentionner que ces études ont été menées avec des PN au repos. Il n'y a pas de données après stimulation.

Or, la stimulation des PN peut aboutir à la formation d'ectosomes, qui sont une forme particulière de MP (car de grande taille, 50 à 200 nm) [Morel, 2005]. Ces MP d'origine granulocytaire peuvent-elles influencer la coagulation ?

Ces éléments ne sont pas à confondre avec les MP procoagulantes d'origine monocyttaire ou plaquettaire, pouvant se fixer à la surface des PN [Osterud, 2005 ; Eilertsen & Osterud 2005]

La capacité des PN à générer des MP ou ectosomes est une notion déjà ancienne [Hess, 1999 ; Mesri, 1998]. Il leur était dans un premier temps attribué un rôle dans la défense cellulaire contre les attaques du complément. Mesri et Altieri ont montré, chez des volontaires sains que des MP dérivées des PN circulent à l'état normal, et augmentent rapidement après des stimuli proinflammatoires (comme le fMLP ou l'IL8) [Mesri et Altieri, 1999]. Ces fragments de membranes sont également susceptibles d'être libérés par le PN après stimulation par le PMA ou l'ionophore [Gasser, 2003]. Plusieurs équipes ont étudié ces ectosomes. Vu plus particulièrement sous l'angle de la coagulation, Gasser a montré que ceux-ci fixent l'annexine V, molécule qui, en présence de calcium, se lie aux PL<sub>A</sub>. Les vésicules issues de PN sont donc susceptibles de servir de support à l'assemblage des complexes de la coagulation. De plus, ces ectosomes expriment CD62L, qui leur permet d'adhérer à de nombreux types cellulaires (en premier lieu, cellules endothéliales et plaquettes) ; mais aussi, l'élastase (HNE) ou la MPO, qui, comme nous le verrons, peuvent influencer sur les mécanismes mis en jeu dans la coagulation. Enfin, l'expression de FT, par ces unités, est comme nous l'avons détaillé précédemment toujours sujet à débat [Giesen, 1999 ; Osterud, 2004 ; Nakamura, 2004].

L'étude quantitative et surtout qualitative de ces microparticules, quelle que soit leur origine cellulaire, est un sujet en pleine expansion car celles-ci seraient impliquées dans la survenue de mécanismes thrombotiques et pourraient même constituer un marqueur de ces événements [Freyssinet, 2003 ; Morel, 2007].

Au-delà de son rôle de support de la coagulation, la membrane des PN possède de très nombreuses protéines de surface, dont certaines sont des récepteurs pour plusieurs molécules-clé de la coagulation :

- la thrombine en premier lieu dont l'activité sur les granulocytes est discutée. Elle possède une activité chimiotactique mais le récepteur granulocytaire serait de nature différente du récepteur plaquettaire à la thrombine (PAR-1) [Hoffman, 1993 ; Jenkins, 1995] et elle induit une adhérence transitoire et réversible des PN aux cellules endothéliales [Gillis, 1997]. Certains auteurs supposent que la thrombine n'est pas susceptible d'activer fortement les PN, car incapable de provoquer une dégranulation [Kannan, 2002]. Ainsi, les effets de la thrombine sur le PN ne semblent pas majeurs.

- le fibrinogène et la fibrine peuvent se lier aux PN et le récepteur a été identifié comme étant CD11b/CD18 (ou Mac-1) [Wright, 1988]. La liaison *in vitro* du fibrinogène avec Mac-1 à la surface des PN induit de nombreuses modifications cellulaires : mobilisation calcique, dégranulation, up-régulation de l'adhérence, augmentation de la migration et diminution de l'apoptose [Rubel, 2001 ; Flick, 2004]. Toutefois, cette liaison semble intervenir dans la modulation des phénomènes inflammatoires plutôt que dans la coagulation proprement dite.

- Mac-1 a également été évoqué comme étant aussi un récepteur membranaire pour le facteur X [Altieri & Edgington, 1988 ; Bouchard, 2003], à la surface des monocytes principalement mais aussi des PN après stimulation. Cette fixation permet la génération de thrombine à la surface des cellules en l'absence de FT [Altieri, 1988].

Les PN expriment aussi EPR-1 (*Effector Cell Protease Receptor-1*), décrit comme le récepteur du facteur X activé, pouvant donc potentiellement aboutir à la génération de thrombine [Altieri, 1994]. Néanmoins, aucune donnée n'existe sur la fixation du FXa sur EPR-1 à la surface des PN [Gillis, 1997], les études ayant toutes été réalisées avec des leucocytes mononucléés. Aussi, l'existence même de ce récepteur est discutée [Zaman & Conway, 2000 ; Krupiczkoj, 2008].

- les PN peuvent interagir avec le système de la PC/PS/TM [Gillis, 1997]. En effet, ils expriment EPCR, récepteur endothélial à la PC, leur permettant de lier à la fois la PC ou la PCa. Cette liaison aboutit à une diminution de la migration cellulaire induite par différents chimioattractants [Sturn, 2003]. Les PN peuvent aussi lier la PS de manière calcium-dépendante. Enfin, les PN synthétisent la thrombomoduline. Malgré toutes ces données, il semble pourtant que les PN ne soient pas capables de convertir la PC en PCa, qu'ils soient au repos ou activés [Conway, 1992].

- les PN exposent à leur surface plusieurs récepteurs leur permettant d'interagir directement avec les plaquettes [Chavakis, 2003 ; Vandendries, 2004 ; Zarbock, 2007] : PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) et les intégrines CD11a/CD18 et CD11b/CD18 (figure 8).

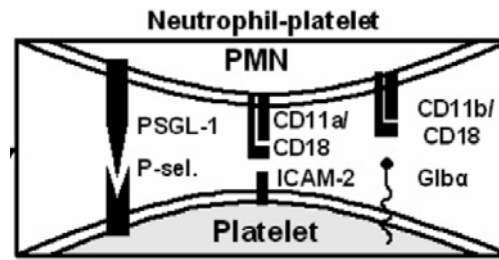


Figure 8 : Exemples d'interactions entre PN et plaquettes (d'après Zarbock, 2007)

L'interaction P-sélectine / PSGL-1 est impliquée dans le *rolling* des PN à la surface de plaquettes agglutinées ; et les interactions GPIbα / Mac-1 ainsi que ICAM-2 / CD11a/CD18 permettent l'adhérence ferme des cellules entre-elles [Zarbock, 2007].

Ces interactions favorisent le recrutement des PN non seulement au niveau des sites inflammatoires mais aussi sur le lieu de formation d'un thrombus.

*Nb : ce vaste sujet fait l'objet d'une littérature abondante, que nous ne détaillerons pas dans ce travail, centré sur le PN isolé.*



## MEMO

*Même si la surface du PN semble pouvoir accueillir certaines protéines ou complexes de la coagulation, la signification in vivo de cette capacité reste mal déterminée mais il apparaît peu probable qu'elle soit prépondérante. Les données disponibles suggèrent que l'interaction du fibrinogène ou du FXa par exemple, avec leurs récepteurs membranaires sur le PN aurait des conséquences fonctionnelles sur les mécanismes inflammatoires, et non sur le déroulement de la coagulation elle-même. Aussi, si l'exploration et la connaissance grandissante des microparticules leur confèrent un rôle non négligeable dans l'hémostase et surtout la thrombose, l'implication des MP dérivées du PN est encore peu documentée. Enfin, le PN peut interagir de façon très étroite avec les plaquettes, modulant très certainement les mécanismes de l'hémostase et inflammatoires.*





## **Références**

- Altieri DC, Edgington TS. A monoclonal antibody reacting with distinct adhesion molecules defines a transition in the functional state of the receptor CD11b/CD18 (Mac-1). *J Immunol.* 1988;141:2656-60.
- Altieri DC, Morrissey JH, Edgington TS. Adhesive receptor Mac-1 coordinates the activation of factor X on stimulated cells of monocytic and myeloid differentiation: an alternative initiation of the coagulation protease cascade. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:7462-6.
- Altieri DC. Molecular cloning of effector cell protease receptor-1, a novel cell surface receptor for the protease factor Xa. *J Biol Chem.* 1994;269:3139-42.
- Bouchard BA, Tracy PB. The participation of leukocytes in coagulant reactions. *J Thromb Haemost.* 2003;1:464-9.
- Bruckheimer EM, Schroit AJ. Membrane phospholipid asymmetry: host response to the externalization of phosphatidylserine. *J Leukoc Biol.* 1996;59:784-8.
- Chavakis T, Santoso S, Clemetson KJ, Sachs UJ, Isordia-Salas I, Pixley RA, Nawroth PP, Colman RW, Preissner KT. High molecular weight kininogen regulates platelet-leukocyte interactions by bridging Mac-1 and glycoprotein Ib. *J Biol Chem.* 2003;278:45375-81.
- Conway EM, Nowakowski B, Steiner-Mosonyi M. Human neutrophils synthesize thrombomodulin that does not promote thrombin-dependent protein C activation. *Blood.* 1992;80:1254-63.
- Eilertsen KE, Østerud B. The role of blood cells and their microparticles in blood coagulation. *Biochem Soc Trans.* 2005;33:418-22.
- Flick MJ, Du X, Degen JL. Fibrin(ogen)-alpha M beta 2 interactions regulate leukocyte function and innate immunity in vivo. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004;229:1105-10.

- Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost.* 2003;1:1655-62.
  
- Gasser O, Hess C, Miot S, Deon C, Sanchez JC, Schifferli JA. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res.* 2003;285:243-57.
  
- Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood.* 2004;104:2543-8.
  
- Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:2311-5.
  
- Gillis S, Furie BC, Furie B. Interactions of neutrophils and coagulation proteins. *Semin Hematol.* 1997;34:336-42.
  
- Hess C, Sadallah S, Hefti A, Landmann R, Schifferli JA. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol.* 1999;163:4564-73.
  
- Hoffman M, Church FC. Response of blood leukocytes to thrombin receptor peptides. *J Leukoc Biol.* 1993;54:145-51.
  
- Jenkins AL, Howells GL, Scott E, Le Bonniec BF, Curtis MA, Stone SR. The response to thrombin of human neutrophils: evidence for two novel receptors. *J Cell Sci.* 1995;108:3059-66.
  
- Kannan S. Role of protease-activated receptors in neutrophil degranulation. *Med Hypotheses.* 2002;59:266-7.
  
- Krupiczkoj MA, Scotton CJ, Chambers RC. Coagulation signalling following tissue injury: focus on the role of factor Xa. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:1228-37.

- McGee MP, Li LC. Functional difference between intrinsic and extrinsic coagulation pathways. Kinetics of factor X activation on human monocytes and alveolar macrophages. *J Biol Chem.* 1991;266:8079-85.
  
- Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol.* 1998;161:4382-7.
  
- Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem.* 1999;274:23111-8.
  
- Morel O, Morel N, Hugel B, Jesel L, Vinzo S, Goichot B, Bakouboula B, Grunebaum L, Freyssinet JM, Toti. Les microparticules circulantes : rôles physiologiques et implications dans les maladies inflammatoires et thrombotiques. *Rev Med Int.* 2005 ;26:791-801.
  
- Morel O, Toti F, Freyssinet JM. [Markers of thrombotic disease: procoagulant microparticles] *Ann Pharm Fr.* 2007;65:75-84.
  
- Nakamura S, Imamura T, Okamoto K. Tissue factor in neutrophils: yes. *J Thromb Haemost.* 2004;2:214-7.
  
- Osterud B. Tissue factor in neutrophils: no. *J Thromb Haemost.* 2004;2:218-20.
  
- Rubel C, Fernández GC, Dran G, Bompadre MB, Isturiz MA, Palermo MS. Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis. *J Immunol.* 2001;166:2002-10.
  
- Sturn DH, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani A, Fukudome K, Wiedermann CJ. Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood.* 2003;102:1499-505.
  
- Tracy PB, Eide LL, Mann KG. Human prothrombinase complex assembly and function on isolated peripheral blood cell populations. *J Biol Chem.* 1985;260:2119-24.
  
- Vandendries ER, Furie BC, Furie B. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2004;92:459-66.

- Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC, Loike JD. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85:7734-8.
- Zaman GJ, Conway EM. The elusive factor Xa receptor: failure to detect transcripts that correspond to the published sequence of EPR-1. Blood. 2000;96:145-8.
- Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. Blood Rev. 2007;21:99-111.

### A.IV.3- Espèces réactives oxygénées dérivées des polynucléaires et hémostase

Depuis plusieurs années, de nombreuses données ont démontré l'importance et la subtilité des systèmes RedOx dans la modulation voire la régulation de nombre de mécanismes physiologiques. Un désordre de cette balance entre systèmes pro- et anti-oxydants induit une situation dite de « stress oxydant », à l'origine notamment de risques (cardio)vasculaires. L'hémostase ne semble pas échapper à cette régulation [Herkert, 2004 ; Görlach, 2005].

Les PN activés étant une source majeure d'EROs, ceux-ci peuvent potentiellement moduler ces mécanismes, et ce, comme nous allons le développer, de façon directe ou indirecte.

De façon directe tout d'abord, car certains dérivés de l'oxygène produits par le PN stimulé ont une activité sur les facteurs de la coagulation ou sur les plaquettes.

En effet, les données de Stief montrent l'augmentation des temps de coagulation (Temps de céphaline + activateur ; Temps de Quick ; Temps de Thrombine) en présence d'oxydants type chloramine, et ce de façon concentration-dépendante. L'auteur montre une inactivation des facteurs V, X, VIII ainsi que du fibrinogène, sans toutefois préciser la méthode de mesure employée [Stief, 2000]. En revanche, dans le même temps, aucun effet des oxydants n'est observé sur les facteurs II, IX et XIII ; une augmentation de l'activité procoagulante du facteur VII est même notée. Pourtant, l'auteur estime que cette activation du FVII n'est pas suffisante pour contrebalancer l'effet anticoagulant résultant de l'inactivation des facteurs précédemment cités. L'auteur note enfin, en présence des oxydants, une inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP ou le collagène. Dans une étude ultérieure, Stief montrera que les oxydants en cause non seulement inhibent la formation d'agrégats plaquettaires mais sont aussi capables de les déstabiliser [Stief, 2001]. Grâce à l'utilisation de piègeurs de radicaux libres (*scavengers*) de spécificités différentes, il montrera que l'espèce réactive dérivée de l'oxygène responsable des observations pré-citées est l'oxygène singulet, noté  $^1\text{O}_2$ .

Cette EROs non radicalaire peut aussi intervenir dans les mécanismes de fibrinolyse [Stief, 2004]. En effet, dans un système *in vitro* de lyse du caillot,  $^1\text{O}_2$  (toujours généré par une chloramine) augmente fortement la destruction du caillot en favorisant la voie de l'urokinase, sans effet marqué sur la voie du t-PA [Stief, 2007].

Toutes ces données indiquent un effet antithrombotique de l'oxygène singulet.

Concernant d'autres EROS, l'activité *in vitro* ainsi qu'*in vivo* sur les plaquettes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été étudiée et celle-ci varie selon sa concentration : à faible concentration H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est proagrégante alors qu'à forte concentration, elle est inhibitrice des fonctions plaquettaires [Görlach, 2005].

A coté de ces effets directs sur les acteurs de la coagulation, les EROs peuvent également agir indirectement en induisant des modifications phénotypiques de certaines cellules qui leur permettrait ainsi de moduler les mécanismes hémostatiques.

En effet, Cadroy montre en 2000, que les PN modulent, par l'intermédiaire des espèces oxygénées qu'ils génèrent, l'expression de facteur tissulaire monocyttaire. Cette modulation dépend une nouvelle fois de la concentration en EROs. A faible concentration (ratio PN / monocytes faible) l'activité FT monocyttaire est augmentée, alors qu'à forte concentration, elle est diminuée par rapport au témoin [Cadroy, 2000]. L'implication des EROs est à nouveau démontrée par l'usage de *scavengers* et d'un système dépourvu de PN, où H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reproduit les effets des PN sur les monocytes précédemment observés.

Enfin, les EROs peuvent interagir avec les cellules endothéliales leur conférant un phénotype procoagulant, d'une part par l'induction d'expression (non physiologique) de FT [Jacobi, 2005 ; Jacobi, 2006] et d'autre part en altérant la production de prostacycline, puissant inhibiteur des fonctions plaquettaires [Cadroy, 2000].



## MEMO

*Les PN activés, producteurs de dérivés oxygénés hautement réactifs, auraient la capacité de moduler, positivement ou négativement, l'hémostase au sens large. Le sens de cette modulation serait sous l'influence de la concentration en dérivés actifs, donc de la concentration en PN (ou de l'intensité de leur stimulation).*



## **Références**

- Cadroy Y, Dupouy D, Boneu B, Plaisancié H. Polymorphonuclear leukocytes modulate tissue factor production by mononuclear cells: role of reactive oxygen species. *J Immunol.* 2000;164:3822-8.
- Görlach A. Redox regulation of the coagulation cascade. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:1398-404.
- Herkert O, Djordjevic T, BelAiba RS, Görlach A. Insights into the redox control of blood coagulation: role of vascular NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the thrombogenic cycle. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6:765-76
- Jacobi J, Kristal B, Chezar J, Shaul SM, Sela S. Exogenous superoxide mediates pro-oxidative, proinflammatory, and procoagulatory changes in primary endothelial cell cultures. *Free Radic Biol Med.* 2005;39:1238-48.
- Jacobi J, Sela S, Cohen HI, Chezar J, Kristal B. Priming of polymorphonuclear leukocytes: a culprit in the initiation of endothelial cell injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:H2051-8.
- Stief TW, Kurz J, Doss MO, Fareed J. Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood. *Thromb Res.* 2000;97:473-80.
- Stief TW, Feek U, Ramaswamy A, Kretschmer V, Renz H, Fareed J. Singlet oxygen ( $^1O(2)$ ) disrupts platelet aggregates. *Thromb Res.* 2001;104:361-70.
- Stief TW. Regulation of hemostasis by singlet-oxygen ( $^1\Delta O_2^*$ ). *Curr Vasc Pharmacol.* 2004;2:357-62.
- Stief TW. Singlet oxygen potentiates thrombolysis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2007;13:259-78.



#### **A.IV.4- Cathepsine G, élastase et Hémostase**

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la cathepsine G (Cath G) et l'élastase (HNE) sont, de par leur structure, proches de certains facteurs de coagulation. De ce fait, elles sont depuis longtemps au cœur des investigations pour tenter de comprendre au moins en partie l'implication des PN dans l'hémostase.

##### **A.IV.4.1 Impact sur la fibrinolyse**

Initialement, le rôle principal qui était attribué à ces protéases, et surtout l'HNE, était une participation aux mécanismes de fibrinolyse, du fait de leur capacité à dégrader fibrine et fibrinogène [Rulot, 1904]. Plow qualifie même l'HNE de protéase majeure dans le système fibrinolytique, après avoir observé que des extraits leucocytaires ont une activité fibrinolytique indépendante du système du plasminogène [Plow, 1975 ; Plow, 1980] et conduisent à des produits de dégradation du fibrinogène structurellement et immunologiquement distincts de ceux dérivés de la plasmine [Plow, 1982]. Ces constatations expérimentales sont étayées par des données en pathologie humaine où des produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène dérivés de l'HNE sont présents en quantité non négligeable dans des situations particulières, dans lesquelles l'hémostase est perturbée telles que la leucémie à promyélocytes [Oudijk, 2000] ou la thrombose veineuse profonde [Kamikura, 2005].

La cathepsine G quant à elle, peut également intervenir mais à un degré moindre que l'élastase [Kluft, 2004].

Toutefois, ce rôle n'est pas « unidirectionnel », et il semble que la puissante activité protéolytique de ces enzymes leur permette aussi de dégrader certains facteurs fibrinolytiques et de ce fait de limiter/empêcher la lyse du caillot [Moir, 2002]. Malgré cela les auteurs estiment que l'activité profibrinolytique demeure prépondérante dans la plupart des cas.

##### **A.IV.4.2 Impact sur la coagulation**

Depuis les 2 dernières décennies une littérature abondante suggère que les deux enzymes (d'ailleurs souvent étudiées en parallèle) n'interviendraient pas qu'au niveau du système de lyse du caillot, mais également dans les mécanismes aboutissant à la génération de thrombine. Et, à nouveau, il est difficile d'établir de conclure clairement si les protéases leucocytaires libérées pendant la coagulation sont pro- ou anticoagulantes.

Les 2 enzymes sont décrites pour agir sur bon nombre de facteurs de la coagulation :

#### ***A.IV.4.21 Prothrombine, thrombine et fibrinogène***

##### *Prothrombine / thrombine :*

La cathepsine G et l'élastase ont été rapportées pour avoir une activité de dégradation sur la prothrombine et la thrombine.

Turkington montre que la Cath G dégrade la prothrombine par attaque des acides aminés en position Phe 40 – Trp 41, provoquant la perte des résidus Gla, nécessaires à l'ancrage des facteurs sur les surfaces cellulaires. La présence d'ions calcium protège la prothrombine de la dégradation par la Cath G [Turkington, 1986].

*Nb : Turkington montrera ensuite, comme nous allons le voir, que cette activité de la Cath G est constante sur tous les facteurs de coagulation vitamine K-dépendants.*

La cathepsine G est également capable de s'attaquer à la thrombine ( $\alpha$ -thrombine) en position Trp 148 – Thr 149, dans la chaîne B, générant une nouvelle forme, appelée  $\zeta$ -thrombine, moins active sur la conversion du fibrinogène en fibrine, et surtout moins stable [Brezniak, 1990].

L'élastase peut elle aussi agir sur l' $\alpha$ -thrombine [Brower, 1987] au niveau d'un site proche de celui de la Cath G : Ala 150 – Asn 151 de la chaîne B, générant 2 fragments reliés par des interactions non covalentes. La thrombine modifiée par l'HNE conserve une activité amidolytique, mais possède une activité procoagulante limitée car elle est moins active sur la conversion du fibrinogène (*vide infra*).

##### *Fibrinogène :*

C'est principalement l'HNE qui est susceptible d'avoir une activité sur le fibrinogène [Gramse, 1978 ; Bach-Gansmo, 1994]. Celle-ci dégrade progressivement le fibrinogène par l'extrémité C-terminale dans la chaîne A $\alpha$ , ce qui s'accompagne d'un allongement des temps de coagulation. De plus, les produits de dégradation de plus haut poids moléculaire ainsi obtenus sont pourvus d'une activité anticoagulante.

#### **A.IV.4.22 Tenase extrinsèque**

##### *Facteur tissulaire :*

Aucune donnée n'est disponible dans la littérature sur une éventuelle activité de l'une ou l'autre des enzymes sur la glycoprotéine FT.

En revanche, l'élastase peut induire l'expression de FT par les cellules endothéliales [Haubitz, 2001].

##### *Facteur VII :*

Comme le montrent les travaux de plusieurs équipes, les 2 enzymes sont capables de protéolyser le FVII, pour aboutir à une forme inactive. La Cath G dégrade le FVII entraînant un allongement des temps de coagulation en plasma immunodéplété en FVII [Nicolaisen, 1992]. Turkington montre que l'enzyme est responsable de la perte des résidus Gla du FVII par clivage en Phe 40 – Trp 41 [Turkington, 1992]. Cette dégradation est inefficace en milieu calcique. Ces données sont confirmées par Anderssen à la fois en système purifié et en surnageant de PN stimulés par le PMA +/- un inhibiteur de la Cath G. Cette équipe étend les résultats à l'HNE dont l'action est similaire à la Cath G [Anderssen, 1993].

#### **A.IV.4.23 Prothrombinase**

##### *Facteur X :*

Turkington a étudié la digestion *in vitro* du FX incubé en présence de Cath G ou d'HNE [Turkington, 1991]. A l'aide de tests de coagulation, il montre que l'une et l'autre des protéases induit une perte d'activité du FX, et que la présence d'ions calcium protège le FX de la dégradation par la Cath G mais, de façon surprenante, pas de l'HNE. La digestion par la Cath G aboutit à un FX dépourvu de résidus Gla, alors que l'action de l'HNE aboutit à la formation de nombreux produits de dégradation.

Toutefois, Plescia et Altieri ont montré, en étudiant l'activité procoagulante de monocytes, qu'en présence d'ions calcium, la Cath G pouvait cliver le FX en un dérivé actif d'environ 54 kDa, par attaque au niveau des acides aminés Leu 177 – Leu 178 situés dans le peptide d'activation du zymogène. Les mêmes expérimentations menées avec l'HNE n'ont montré aucune action de celle-ci sur le FX. [Plescia et Altieri, 1996].

Deux effets contradictoires ont donc été décrits concernant la Cath G.

*Facteur V :*

Les 2 enzymes sont capables d'agir sur le facteur V [Camire, 1998], et ce, au niveau de plusieurs sites distincts. Toutefois, le FV protéolysé n'a pas d'activité cofacteur dans la prothrombinase.

Pourtant, en 1993, Turkington montre que la Cath G peut activer le FV en présence ou en absence de calcium [Turkington, 1993]. Il montre également une activation par l'HNE en milieu purifié, qui disparaît en milieu citraté, probablement du fait de la présence d'inhibiteurs de l'enzyme.

Samis dans un essai d'activité prothrombinase en milieu non plasmatique montre aussi que l'HNE active dans un premier temps le FV, mais que l'activité cofacteur diminue progressivement [Samis, 1997], confirmant ainsi les données anciennes de Oates et Salem [Oates & Salem, 1987].

Les activités apparaissent donc plus évidentes en système purifié qu'en milieu plasmatique, très probablement en raison de la présence de nombreux inhibiteurs des enzymes.

**A.IV.4.24 Tenase intrinsèque**

*Facteur VIII :*

En 1980, deux équipes montrent des effets protéolytiques de 2 enzymes granulocytaires sur le FVIII : « *Elastase-like protease* », soit l'HNE et « *chymotrypsine-like protease* », soit la Cath G. Toutes deux aboutissent à une perte d'activité procoagulante du FVIII [Varadi, 1980 ; Kopec, 1980].

Plus récemment, Gale et Rozenshteyn ont au contraire montré que la Cath G pouvait activer le FVIII, cette fois en utilisant la protéine purifiée non complexée avec le FvW, comme dans les études précédemment citées [Gale & Rozenshteyn, 2008]. Toutefois, l'activité procoagulante détectée n'est pas optimale (car moindre que celle induite par thrombine) mais suffisante pour une activité cofacteur.

*Facteur IX :*

En 1983, Takaki indique que l'HNE clive le FIX, générant des fragments de taille similaire à ceux obtenus après activation du FIX par le facteur XIa ; cependant, ce clivage n'aboutit pas à une activation du FIX. De plus, les auteurs soulignent l'importance du calcium dans la réaction [Takaki, 1983]. Ceci est ensuite repris par Turkington, qui montre

l'inactivation du FIX en présence de Cath G, une nouvelle fois, par perte des résidus Gla. La présence d'ions calcium protège de la dégradation [Turkington, 1992].

Samis note ensuite que l'HNE clive le zymogène au niveau de sites proches de ceux aboutissant à son activation, mais que la protéine générée n'a pas d'effets sur la coagulation [Samis, 1998].

#### **A.IV.4.25 Systèmes inhibiteurs**

##### *Tissue factor pathway inhibitor – TFPI :*

Les 2 enzymes peuvent agir sur le TFPI [Lwaleed & Bass, 2005].

Concernant l'HNE, elle peut cliver le TFPI en Thr 87 – Thr 88, au sein du peptide de liaison entre les domaines Kunitz-1 et Kunitz-2 [Higuchi, 1992]. Ceci empêche l'inhibition du complexe FT/VIIa par le TFPI, mais aussi l'inhibition du FXa. L'HNE est capable de restaurer l'activité FT d'un complexe quaternaire Xa-TFPI-TF/VIIa préformé, suggérant une modulation non négligeable de l'activité FT ; Aussi, Higuchi évoque l'existence d'autres sites de clivage, à proximité de Thr 87 suite à l'observation de 3 produits de dégradation de faible poids moléculaire contenant l'extrémité N-terminale du TFPI. Toutefois, Petersen, s'il confirme l'effet de l'HNE en Thr 87 – Thr 88, observe que l'inhibition n'est pas aussi importante qu'Higuchi le prétend [Petersen, 1992]. Ces différences peuvent être dues aux conditions expérimentales. En effet, dans les expérimentations de Petersen le TFPI est en excès par rapport à l'HNE alors que c'est l'inverse dans celles d'Higuchi. Enfin, Petersen montre de la même façon que l'HNE restaure l'activité amidolytique du Xa après inhibition initiale par le TFPI.

Concernant la Cath G, il montre également qu'elle induit une faible inhibition du TFPI. Contrairement à l'HNE, le clivage est multiple et aboutit à la formation de nombreux fragments. Les sites de clivage se situant en Lys 86 – Thr 87 ; Leu 89 – Gln 90 ; Tyr 159 – Gly 160 et potentiellement en His 8 – Thr 9 (Figure 9). Ces données n'ont pas été confirmées par d'autres équipes. Aussi, cette inhibition est temporairement plus efficace en présence de quantité stoechiométrique de Xa (« temporairement » seulement, car dans le même temps, la Cath G dégrade le TFPI).

Enfin, une étude récente montre, cette fois en milieu cellulaire à l'aide de culture d'HUVEC, que l'incubation avec Cath G et HNE en quantités croissantes aboutit à une perte dose-dépendante d'expression du TFPI membranaire. C'est HNE qui supporte l'activité la plus importante [Steppich, 2008].

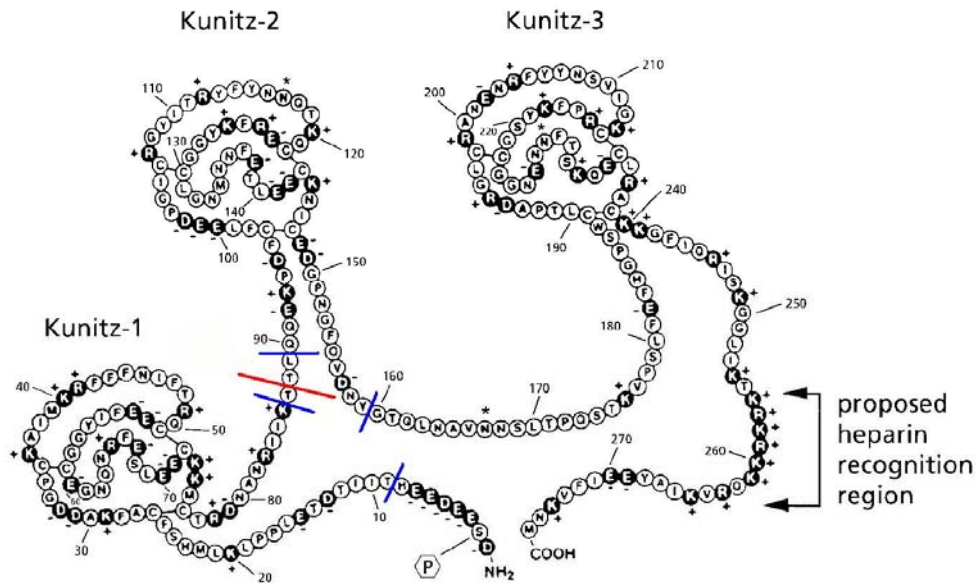


Figure 9 : Sites de clivage du TFPI par l'HNE (en rouge) et la Cath G (en bleu)

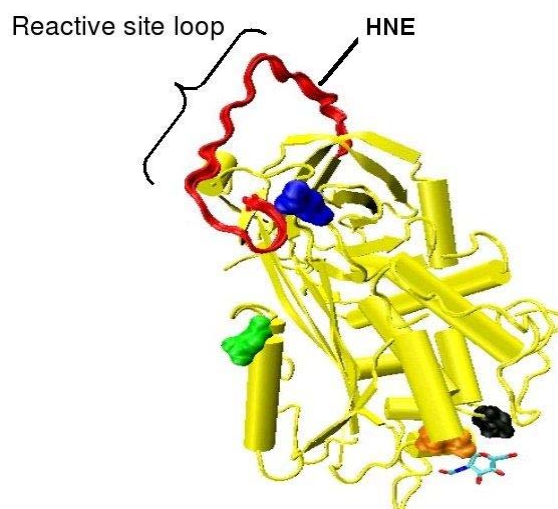
#### Antithrombine :

Seule l'HNE a été rapportée de façon claire comme ayant une activité sur l'AT. En effet, elle est capable d'inactiver l'AT par un clivage protéolytique limité et spécifique [Jochum, 1981], et cette action est accélérée par la présence d'héparine [Jordan, 1987], sur laquelle vont se lier à la fois l'AT et l'HNE [Jordan, 1989]. Le site de clivage se situe en plein cœur de la boucle réactive, dans la région carboxy-terminale de l'AT, en position isoleucine 390 (Figures 10 et 11), soit très proche du site réactif de l'AT avec ses cibles, situé en Arg 393 – Ser 394 et aboutit donc la perte d'un fragment d'environ 5 kDa [Carrell, 1985].

Cet effet de l'HNE est maintenant bien admis et est même considéré comme un des mécanismes physiopathologiques majeurs des coagulopathies survenant au cours du sepsis [Duswald, 1985 ; Jochum, 1994].



Figure 10 : Séquence peptidique du site réactif de l'AT et site de clivage par l'HNE



**Figure 11 : Structure tertiaire de l'AT et site de clivage par l'HNE**

#### *Système PC/PS :*

Turkington, dans ses essais sur les facteurs vitamine K-dépendants a évidemment étudié la PC et la PS. L'action de la Cath G, comme pour les autres facteurs (II, VII, IX X) aboutit à une PC dépourvue de domaine Gla, et la présence d'ions calcium protège contre cette dégradation [Turkington, 1991]. La même activité est observée sur la PS [Turkington, 1993]. Toutefois, si le clivage s'effectue à une position classique (position 40 - 41), celui-ci ne concerne pas les acides aminés Phe et Trp, mais Phe 40 et Tyr 41 (qui correspond tout de même à un site classique de la Cath G) (figure 12).

#### **A.IV.4.26 Autres protéines de la coagulation**

##### *Système contact :*

Peu de données sont disponibles, mais il semble que des préparations purifiées d'HNE ou de Cath G soient capables d'inactiver plusieurs protéines du système contact : kallicréine et FXIIa, ainsi que leurs zymogènes (prékallicréine et FXII respectivement). L'HNE peut aussi dégrader le KHPM (kininogène de haut poids moléculaire) [Yarovaya, 2002].

##### *Facteur XIII :*

L'élastase et la cathepsine G peuvent interagir avec le FXIIIa (stabilisateur de la fibrine), induisant une inactivation et une dégradation de celui-ci [Bagoly, 2007] ; ceci amplifierait le pouvoir pro-fibrinolytique qui leur est attribué. Toutefois, certains auteurs ont

aussi montré qu'avant la dégradation du FXIIIa, l'HNE est capable d'activer le zymogène FXIII, en l'absence de thrombine [Henriksson, 1980], permettant ainsi dans un premier temps la stabilisation du réseau de fibrine.

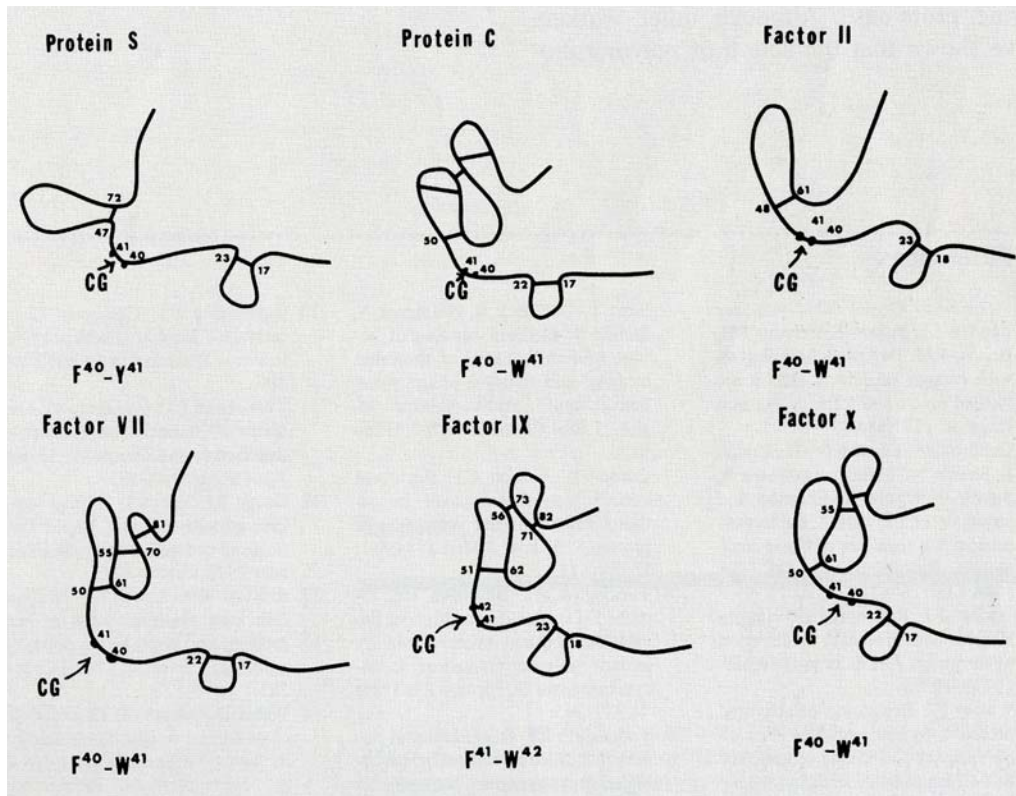


Figure 12 : Action de la Cathepsine G sur les facteurs vitamineK-dépendants (F=Phe ; W=Trp ; Y=Tyr) d'après Turkington, 1993.



Tableau 4 : Résumé des activités de la Cath G sur les facteurs de coagulation

| Cathepsine G    | Activation | Dégradation /<br>perte d'activité | Conséquences potentielles |
|-----------------|------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Fibrinogène     |            |                                   |                           |
| FII             |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| Thrombine       |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| FV              | X          | X                                 | ?                         |
| FVII            |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| FVIII           | X          | X                                 | ?                         |
| FIX             |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| FX              | X          | X                                 | ?                         |
| FXII            |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| Voie contact    |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| FXIII           |            |                                   |                           |
| FXIIIa          |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| TFPI            |            | X                                 | <b>PRO</b> coagulant      |
| FT/VIIa-TFPI-Xa |            |                                   |                           |
| AT              |            |                                   |                           |
| PC              |            | X                                 | <b>PRO</b> coagulant      |
| PS              |            | X                                 | <b>PRO</b> coagulant      |

Tableau 5 : Résumé des activités de l'HNE sur les facteurs de coagulation

| Elastase        | Activation | Dégradation /<br>perte d'activité | Conséquences potentielles |
|-----------------|------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Fibrinogène     |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| FII             |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| Thrombine       |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| FV              | X          | X                                 | ?                         |
| FVII            |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| FVIII           |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| FIX             |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| FX              |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| FXII            |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| Voie contact    |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| FXIII           | X          |                                   | <b>PRO</b> coagulant      |
| FXIIIa          |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| TFPI            |            | X                                 | <b>PRO</b> coagulant      |
| FT/VIIa-TFPI-Xa |            | X                                 | <b>ANTI</b> coagulant     |
| AT              |            | X                                 | <b>PRO</b> coagulant      |
| PC              |            |                                   |                           |
| PS              |            |                                   |                           |

#### A.IVI.4.3 Impact sur les plaquettes

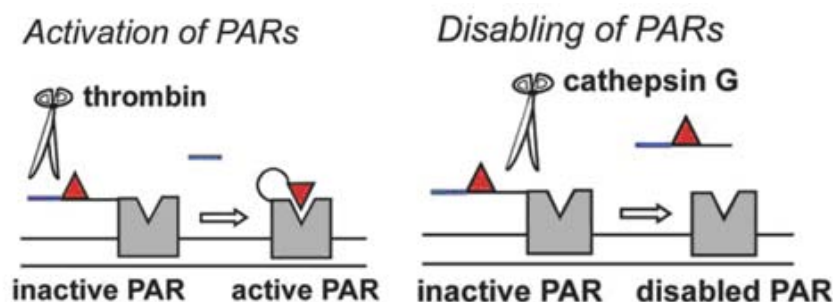
Parallèlement à leurs activités protéasiques sur des molécules plasmatiques ou plus généralement en phase fluide, la Cath G et l'HNE sont également capables d'agir sur des molécules présentes à la surface cellulaire, permettant l'induction de signaux intracellulaires de transduction, aboutissant à la modulation de plusieurs phénomènes (inflammation, ... voir généralités). Concernant plus particulièrement l'hémostase, ces enzymes peuvent interagir avec les plaquettes. Mais, à nouveau, les conséquences sur les mécanismes (pro- ou anticoagulant ?) sont loin d'être claires [Si-Tahar, 1998].

Ces données dérivent des observations de Chignard qui montre que le surnageant de PN stimulés par le fMLP est capable d'activer les plaquettes, suggérant la mise en jeu d'un médiateur soluble, identifié ensuite comme appartenant à la famille des sérines-protéases [Chignard, 1986].

La cathepsine G se révèle en effet être un puissant agoniste plaquettaire [Selak, 1988 ; Evangelista, 1991 ; Renesto & Chignard, 1995 ; Cerletti, 1995]. L'enzyme purifiée permet une augmentation d'expression de la P-sélectine plaquettaire, une formation accrue de TXB<sub>2</sub>, une libération de sérotonine à partir des grains denses, parallèlement à une agrégation plaquettaire. Cette activation se fait par modification des flux calciques plaquettaires et a été dans un premier temps considérée comme différente de celle induite par la thrombine [Cerletti, 1995]. En fait, Si-Tahar montre que l'activation par la Cath G emprunte les mêmes voies de signalisation que la thrombine, aboutissant à une ouverture des canaux calciques de la membrane ainsi qu'à une mobilisation du calcium intraplaquettaire [Si-Tahar, 1996]. Toutefois, il est admis que les récepteurs plaquettaires pour la thrombine et la Cath G diffèrent [Si-Tahar, 1998]. De plus, l'activité de la Cath G sur les plaquettes est dépendante de son site actif, donc de son activité protéasique. Ceci suggère que les signaux de transduction seraient médiés par un type particulier de récepteurs, appelé PAR (*Protease-activated receptor*).

Les PARs sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, dont le mode d'action est inhabituel [Ossovskaya, 2004 ; Coughlin, 2005]. En effet, la partie extracellulaire du récepteur est clivable par une protéase au niveau amino-terminal, exposant alors une nouvelle séquence d'acides aminés interagissant avec le PAR lui-même (on parle de *tethered ligand*). Le prototype de cette famille de récepteurs est PAR-1, responsable principal de l'activité de la thrombine sur les plaquettes (figure 13).

Il a ainsi été évoqué que la Cath G active les plaquettes par l'intermédiaire d'un PAR, et il est établi que ce n'est pas PAR-1 : Sambrano a fourni plusieurs arguments suggérant l'implication de PAR-4 [Sambrano, 2000]. Mais cette notion reste controversée [Cumashi, 2001]. Dans le même temps, la Cath G s'est révélée capable d'interagir avec PAR-1, mais le clivage induit une perte du peptide ligand, et donc aboutit à une inactivation du récepteur (figure 13).



**Figure 13 : Exemple de mécanismes d'activation et d'inactivation des PARs (d'après Ossovskaya, 2004)**

La cathepsine G semble donc par l'intermédiaire des PARs, à la fois activer les plaquettes, mais aussi empêcher l'activation par la thrombine.

Ce ne sont pas les seuls effets sur les plaquettes dont elle soit responsable ; en effet, la Cath G peut interagir avec la sous-unité Ib $\alpha$  du complexe GPIb-V-IX à la surface plaquettaire, empêchant ainsi la liaison de celui-ci avec le vWF ou la thrombine [Si-Tahar, 1998]. Ceci réduit les capacités d'adhérence des plaquettes au sous-endothélium ainsi que leur activation. Enfin, Molino montre qu'elle induit la mobilisation ainsi que l'activation de GPIIb/IIIa à la surface des plaquettes, afin de permettre la liaison avec le fibrinogène [Molino, 1993]. Cet effet va de paire avec l'activation et l'agrégation plaquettaire.

Concernant l'HNE, celle-ci n'a aucun effet activateur plaquettaire par elle-même [Si-Tahar, 1998]. En revanche, elle sensibilise et améliore la réponse plaquettaire à la Cath G, grâce à un clivage limité de la sous-unité  $\alpha$ Ib (GPIIb) provoquant un changement de conformation et la liaison du fibrinogène [Si-Tahar, 1997]. De même que la Cath G, l'HNE est capable de cliver la sous-unité Ib $\alpha$  de GPIb-V-IX, mais elle peut en plus s'attaquer au domaine extra-cellulaire de GPV. Ceci induit une perte importante de la fonctionnalité du récepteur [Si-Tahar, 1998].

Enfin, l'HNE peut aussi interagir avec les PARs, mais les conséquences sont moins claires. Celle-ci est capable d'inactiver PAR-2 (exprimé par les cellules endothéliales) mais également PAR-1 [Ossovskaia, 2004].



## MEMO

*Les sérine-protéases granulocytaires cathepsine G et élastase ont de multiples points d'impact éventuels sur l'hémostase au sens large dont les conséquences apparaissent une nouvelle fois potentiellement antinomiques.*

- Au niveau de l'hémostase primaire, la Cath G se révèle être un puissant activateur plaquettaire, mais elle peut également limiter l'action de la thrombine sur les plaquettes.*
- Au niveau de la coagulation ensuite et surtout, l'une et l'autre des 2 enzymes ont une activité protéasique sur la quasi-totalité des protéines intervenant dans la génération de thrombine. Mais cette activité aboutit selon les cas soit à une activation soit à une dégradation avec perte d'activité de la protéine en question, ce qui est à l'origine d'une modulation très complexe des phénomènes.*
- Au niveau enfin de la stabilisation du caillot et de la fibrinolyse, dans lesquelles les propriétés profibrinolytiques de l'HNE sont maintenant admises.*

*Ainsi, de par ce spectre d'activité extrêmement varié, il demeure très ardu de définir clairement si l'une ou l'autre de ces 2 enzymes est capable d'induire un phénotype pro- ou anti-coagulant, ou plutôt favorisant ou limitant les mécanismes de l'hémostase.*



## **Références**

- Anderssen T, Halvorsen H, Bajaj SP, Osterud B. Human leukocyte elastase and cathepsin G inactivate factor VII by limited proteolysis. *Thromb Haemost.* 1993;70:414-7.
- Bach-Gansmo ET, Halvorsen S, Godal HC, Skjønberg OH. Impaired coagulation of fibrinogen due to digestion of the C-terminal end of the A alpha-chain by human neutrophil elastase. *Thromb Res.* 1994;73:61-8.
- Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L. Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot. *Thromb Haemost.* 2007;98:359-67.
- Brezniak DV, Brower MS, Witting JI, Walz DA, Fenton JW 2nd. Human alpha- to zeta-thrombin cleavage occurs with neutrophil cathepsin G or chymotrypsin while fibrinogen clotting activity is retained. *Biochemistry.* 1990;29:3536-4
- Brower MS, Walz DA, Garry KE, Fenton JW 2nd. Human neutrophil elastase alters human alpha-thrombin function: limited proteolysis near the gamma-cleavage site results in decreased fibrinogen clotting and platelet-stimulatory activity. *Blood.* 1987;69:813-9.
- Camire RM, Kalafatis M, Tracy PB. Proteolysis of factor V by cathepsin G and elastase indicates that cleavage at Arg1545 optimizes cofactor function by facilitating factor Xa binding. *Biochemistry.* 1998;37:11896-906.
- Cerletti C, Evangelista V, Molino M, de Gaetano G. Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb Haemost.* 1995;74:218-23.
- Chignard M, Selak MA, Smith JB. Direct evidence for the existence of a neutrophil-derived platelet activator (neutrophilin). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:8609-13.
- Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1800-14.

- Cumashi A, Ansuini H, Celli N, De Blasi A, O'Brien PJ, Brass LF, Molino M. Neutrophil proteases can inactivate human PAR3 and abolish the co-receptor function of PAR3 on murine platelets. *Thromb Haemost.* 2001;85:533-8.
- Duswald KH, Jochum M, Schramm W, Fritz H. Released granulocytic elastase: an indicator of pathobiochemical alterations in septicemia after abdominal surgery. *Surgery.* 1985;98:892-9.
- Evangelista V, Rajtar G, de Gaetano G, White JG, Cerletti C. Platelet activation by fMLP-stimulated polymorphonuclear leukocytes: the activity of cathepsin G is not prevented by antiproteinases. *Blood.* 1991;77:2379-88.
- Gale AJ, Rozenshteyn D. Cathepsin G, a leukocyte protease, activates coagulation factor VIII. *Thromb Haemost.* 2008;99:44-51.
- Gramse M, Bingenheimer C, Schmidt W, Egbring R, Havemann K. Degradation products of fibrinogen by elastase-like neutral protease from human granulocytes. Characterization and effects on blood coagulation in vitro. *J Clin Invest.* 1978;61:1027-33.
- Haubitz M, Gerlach M, Kruse HJ, Brunkhorst R. Endothelial tissue factor stimulation by proteinase 3 and elastase. *Clin Exp Immunol.* 2001;126:584-8.
- Henriksson P, Nilsson IM, Ohlsson K, Stenberg P. Granulocyte elastase activation and degradation of factor XIII. *Thromb Res.* 1980;18:343-51.
- Higuchi DA, Wun TC, Likert KM, Broze GJ Jr. The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood.* 1992;79:1712-9.
- Jochum M, Lander S, Heimbürger N, Fritz H. Effect of human granulocytic elastase on isolated human antithrombin III. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1981;362:103-12.
- Jochum M, Gippner-Steppert C, Machleidt W, Fritz H. The role of phagocyte proteinases and proteinase inhibitors in multiple organ failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:S123-30.

- Jordan RE, Kilpatrick J, Nelson RM. Heparin promotes the inactivation of antithrombin by neutrophil elastase. *Science*. 1987;237:777-9.
  
- Jordan RE, Nelson RM, Kilpatrick J, Newgren JO, Esmon PC, Fournel MA. Inactivation of human antithrombin by neutrophil elastase. Kinetics of the heparin-dependent reaction. *J Biol Chem*. 1989;264:10493-500.
  
- Kamikura Y, Wada H, Nobori T, Matsumoto T, Shiku H, Ishikura K, Yamada N, Nakano T, Kazahaya Y, Sawai T, Matsuda M. Elevated plasma levels of fibrin degradation products by granulocyte-derived elastase in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res*. 2005;115:53-7.
  
- Kluft C. The fibrinolytic system and thrombotic tendency. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003 Sep-2004 Dec;33:425-9.
  
- Kopeć M, Bykowska K, Lopaciuk S, Jelenska M, Kaczanowska J, Sopata I, Wojtecka E. Effects of neutral proteases from human leukocytes on structure and biological properties of human factor VIII. *Thromb Haemost*. 1980;43:211-7.
  
- Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol*. 2006;208:327-39.
  
- Molino M, Di Lallo M, Martelli N, de Gaetano G, Cerletti C. Effects of leukocyte-derived cathepsin G on platelet membrane glycoprotein Ib-IX and IIb-IIIa complexes: a comparison with thrombin. *Blood*. 1993;82:2442-51.
  
- Nicolaisen EM, Petersen LC, Thim L, Jacobsen JK, Christensen M, Hedner U. Generation of Gla-domainless FVIIa by cathepsin G-mediated cleavage. *FEBS Lett*. 1992;306:157-60.
  
- Oates AM, Salem HH. The regulation of human factor V by a neutrophil protease. *Blood*. 1987;70:846-51.
  
- Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*. 2004;84:579-621.



- Oudijk EJ, Nieuwenhuis HK, Bos R, Fijnheer R. Elastase mediated fibrinolysis in acute promyelocytic leukemia. *Thromb Haemost.* 2000;83:906-8.
- Carrell RW, Owen MC. Plakalbumin, alpha 1-antitrypsin, antithrombin and the mechanism of inflammatory thrombosis. *Nature.* 1985 Oct 24-30;317(6039):730-2.
- Petersen LC, Bjørn SE, Nordfang O. Effect of leukocyte proteinases on tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 1992;67:537-41.
- Plescia J, Altieri DC. Activation of Mac-1 (CD11b/CD18)-bound factor X by released cathepsin G defines an alternative pathway of leucocyte initiation of coagulation. *Biochem J.* 1996;319:873-9.
- Plow EF, Edgington TS. An alternative pathway for fibrinolysis. I. The cleavage of fibrinogen by leukocyte proteases at physiologic pH. *J Clin Invest.* 1975;56:30-8.
- Plow EF. The major fibrinolytic proteases of human leukocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1980;630:47-56.
- Plow EF. Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway. *J Clin Invest.* 1982;69:564-72.
- Renesto P, Chignard M. Neutrophil-mediated platelet activation: a key role for serine proteinases. *Gen Pharmacol.* 1995;26:905-10.
- Rulot H. Intervention des leucocytes dans l'autolyse de la fibrine. *Arch Int Physiol Biochim.* 1904;1:152-8.
- Sambrano GR, Huang W, Faruqi T, Mahrus S, Craik C, Coughlin SR. Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J Biol Chem.* 2000;275:6819-23.
- Samis JA, Garrett M, Manuel RP, Nesheim ME, Giles AR. Human neutrophil elastase activates human factor V but inactivates thrombin-activated human factor V. *Blood.* 1997;90:1065-74.

- Samis JA, Kam E, Nesheim ME, Giles AR. Neutrophil elastase cleavage of human factor IX generates an activated factor IX-like product devoid of coagulant function. *Blood*. 1998;92:1287-96.
- Selak MA, Chignard M, Smith JB. Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochem J*. 1988;251:293-9.
- Si-Tahar M, Renesto P, Falet H, Rendu F, Chignard M. The phospholipase C/protein kinase C pathway is involved in cathepsin G-induced human platelet activation: comparison with thrombin. *Biochem J*. 1996;313:401-8.
- Si-Tahar M, Pidard D, Balloy V, Moniatte M, Kieffer N, Van Dorsselaer A, Chignard M. Human neutrophil elastase proteolytically activates the platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  through cleavage of the carboxyl terminus of the  $\alpha\text{IIb}$  subunit heavy chain. Involvement in the potentiation of platelet aggregation. *J Biol Chem*. 1997;272:11636-47.
- Si-Tahar M, Pidard D, Chignard M. Le dialogue neutrophiles-plaquettes. *Hématologie*. 1998;4:449-52.
- Steppich BA, Seitz I, Busch G, Stein A, Ott I. Modulation of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1 by neutrophil proteases. *Thromb Haemost*. 2008;6:1068-1075.
- Takaki A, Enfield DL, Thompson AR. Cleavage and inactivation of Factor IX by granulocyte elastase. *J Clin Invest*. 1983;72:1706-15.
- Turkington PT, Blumsom NL, Elmore DT. The degradation of bovine and human prothrombin by human polymorphonuclear leukocyte cathepsin G. *Thromb Res*. 1986;44:339-45.
- Turkington PT. Cathepsin G can produce a gla-domainless protein C in vitro. *Thromb Res*. 1991;63:399-406.
- Turkington PT. Degradation of human factor X by human polymorphonuclear leucocyte cathepsin G and elastase. *Haemostasis*. 1991;21:111-6.

- Turkington PT. Cathepsin G, a regulator of human vitamin K, dependent clotting factors and inhibitors. *Thromb Res.* 1992;67:147-55.
- Turkington PT. Cathepsin G inactivates human protein S in vitro. *Haemostasis.* 1993;23:98-103.
- Turkington PT. Cathepsin G activates human factor V in vitro. *Thromb Res.* 1993;72:333-7.
- Váradi K, Marossy K, Asbóth G, Elödi P, Elödi S. Inactivation of human Factor VIII by granulocyte proteases. *Thromb Haemost.* 1980;43:45-8.
- Yarovaya GA, Blokhina TB, Neshkova EA. Contact system. New concepts on activation mechanisms and bioregulatory functions. *Biochemistry (Mosc).* 2002;67:13-24.

#### A.IV.5- Impact en pathologie humaine

Comme nous venons de l'aborder, les PN ont une multitude de points d'impact potentiels dans le (déjà complexe) système hémostatique et les conséquences peuvent apparaître antinomiques : procoagulants par certains aspects, les PN sont aussi anticoagulants par d'autres. Ainsi, si la résultante de cet impact des PN sur l'hémostase est difficile à cerner à partir des travaux fondamentaux *in vitro* ou *ex vivo* cités dans les chapitres précédents, il semble comme nous allons le voir, que cela soit (un peu) plus clair en pathologie humaine.

De nombreuses données suggèrent fortement un rôle procoagulant des PN dans certains contextes pathologiques, où les PN auraient tendance à favoriser la survenue de thrombose plutôt qu'à l'empêcher.

Pour commencer, il convient de mentionner cette étude clinique de Falanga aux résultats marquants [Falanga, 1999], même si elle n'est pas réalisée *stricto sensu* dans un contexte pathologique : dans une population de donneurs sains (N=26), l'injection de facteur de croissance granulocytaire (rHuG-CSF, filgrastim, Neupogen®) à visée de mobilisation et collection de progéniteurs hématopoïétiques pour greffe allogénique, a abouti à des modifications significatives tant qualitatives que quantitatives. En effet, les auteurs notent, pendant la période d'injection (5 à 6 jours), non seulement une augmentation (attendue) du nombre de PN, mais également une activation de ceux-ci (par augmentation d'expression de CD11b/CD18 membranaire, des complexes HNE/ $\alpha$ 1-antitrypsine et de l'activité plasmatique de l'HNE, ces deux derniers paramètres signant une dégranulation des PN). En parallèle, sont notées une augmentation des marqueurs d'activation endothéliale (vWF et thrombomoduline) ainsi que de plusieurs marqueurs d'hypercoagulabilité (F1+2, complexes TAT, D-dimères). De plus, il existe une corrélation entre le niveau d'élévation des complexes HNE/ $\alpha$ 1-antitrypsine avec le nombre de PN, la thrombomoduline, le vWF et F1+2. Même si aucun événement thrombotique n'est à déplorer chez ces donneurs sains, cette étude suggère fortement que l'activation des PN peut traduire/induire un état d'hypercoagulabilité, même uniquement biologique sans retentissement clinique. Enfin, toutes ces modifications ne sont que transitoires et persistent uniquement durant l'administration du G-CSF.

Ensuite, il est maintenant admis que les PN (et les microparticules qui en dérivent) participent activement à la pathogenèse de la thrombose veineuse [Wakefield, 1997 ;

Wakefield, 2008]. Du fait de leurs propriétés d'adhérence réversible (*rolling*) puis ferme à la surface d'un thrombus en constitution, ceux-ci seront activés et cette activation induit une amplification de la formation du caillot par libération de Cath G entre autres et par altération/activation des cellules endothéliales environnantes.

Kamikura a également suggéré que l'HNE (et donc les PN activés) ont un rôle dans la thrombose veineuse, puisque des concentrations significativement plus élevées de produits de dégradation de la fibrine par l'HNE sont mesurées chez les patients atteints de maladie thrombo-embolique veineuse [Kamikura, 2005]. Peu d'études cliniques démontrent toutefois clairement le rôle des PN dans la thrombose veineuse. Une étude récente le suggère indirectement où il est montré que les patients atteints de cancer ayant présenté un épisode thromboembolique veineux ont un risque plus important de complications s'ils ont une leucocytose (principalement due à une augmentation des PN) [Trujillo-Santos, 2008] – il faut toutefois signaler que les complications englobent à la fois événements hémorragiques et récurrence d'événements thrombotiques.

Mais bien plus qu'en pathologie veineuse, l'augmentation de la numération leucocytaire a surtout animé les débats en pathologie artérielle. Dès le milieu du siècle dernier, émerge la notion selon laquelle les patients ayant présenté un infarctus du myocarde et une leucocytose élevée et persistante ont un pronostic péjoratif [Coller, 2005]. Un nombre conséquent d'études cliniques ont depuis tenté d'affiner cette notion [pour une revue, voir Coller, 2005]. Par exemple, Friedman en 1974 rapporte que la numération leucocytaire est significativement plus élevée chez les patients ayant présenté un premier épisode d'infarctus du myocarde par rapport au groupe contrôle. Dans cette étude, il est intéressant de noter que la valeur prédictive de la leucocytose est similaire à celle du niveau de la pression artérielle ou du cholestérol total. Ainsi il est aujourd'hui clairement admis que la leucocytose constitue un facteur prédictif indépendant d'évènements cardiovasculaires futurs, à la fois chez les sujets sains mais aussi chez les patients ayant des antécédents cardiovasculaires (infarctus du myocarde, angor stable ou instable...) [Madjid, 2004].

Et surtout, parmi tous les sous-types de leucocytes, l'association épidémiologique la plus forte est notée avec le nombre des PN [Ernst, 1987 ; Coller, 2005]. Le seuil critique de leucocytose est en revanche très variable d'une étude à l'autre selon leur design, et il convient plutôt de parler de numération leucocytaire élevée plutôt que de leucocytose. Il faut noter que l'augmentation de la numération leucocytaire pourrait n'être considérée que comme un marqueur indirect de l'inflammation chronique rencontrée dans ces pathologies, toutefois, les

mécanismes par lesquels les leucocytes sont susceptibles d'intervenir directement dans la thrombogenèse sont nombreux et il semble par conséquent très peu probable qu'ils ne l'influencent en rien [Coller, 2005].

A côté de la maladie thrombo-embolique veineuse et de la thrombogenèse artérielle, il existe plusieurs autres situations où des perturbations de l'hémostase sont associées à des modifications qualitatives ou quantitatives des PN :

- *Thromboses associées aux biomatériaux* [Gorbet & Sefton, 2004] dans lesquelles le contact des PN avec les membranes des dialyse ou les dispositifs cardiovasculaires permanents (stents) induit leur activation, favorisant ainsi la formation d'un thrombus.

- *Sepsis et coagulation intravasculaire disséminée*, où le rôle majeur de l'HNE dans la dégradation/inactivation de l'AT à l'origine de l'activation systémique de la génération de thrombine est reconnu et largement admis [Fourrier, 1995].

- *Etat prothrombotique associé aux thrombopénies induites par l'héparine (TIH)*. Khairy a montré que le plasma de patients TIH + active les PN de donneurs sains de façon « héparine-» et « immunoglobuline-dépendante » et que les marqueurs d'activation des PN, comme la MPO plasmatique, sont significativement plus élevés chez les patients TIH + [Khairy, 2004].

- *Hémopathies*, comme la leucémie à promyélocytes où les enzymes granulocytaires participent à la CIVD fréquemment associée [Oudijk, 2000] et d'une façon plus générale, les leucémies aiguës myéloïdes [Egbring, 1977], mais surtout - comme nous allons le détailler plus particulièrement ci-après - les syndromes myéloprolifératifs.



## MEMO

*De nombreuses données en pathologie humaine suggèrent que les PN, soit qualitativement (activation) soit quantitativement (hyperleucocytose), sont activement associés à des mécanismes prothrombotiques et contribuent très certainement in vivo à la thrombogenèse.*



## **Références**

- Coller BS. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:658-70.
  
- Egbring R, Schmidt W, Fuchs G, Havemann K. Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects. *Blood.* 1977;49:219-31.
  
- Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *JAMA.* 1987;257:2318-24.
  
- Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Manarini S, Oldani E, Giovanelli S, Galbusera M, Cerletti C, Barbui T. Neutrophil activation and hemostatic changes in healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1999;93:2506-14.
  
- Fourrier F, Jourdain M, Tournois A, Caron C, Goudemand J, Chopin C. Coagulation inhibitor substitution during sepsis. *Intensive Care Med.* 1995;21:S264-8.
  
- Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials.* 2004;25:5681-703.
  
- Kamikura Y, Wada H, Nobori T, Matsumoto T, Shiku H, Ishikura K, Yamada N, Nakano T, Kazahaya Y, Sawai T, Matsuda M. Elevated plasma levels of fibrin degradation products by granulocyte-derived elastase in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res.* 2005;115:53-7.
  
- Khairy M, Lasne D, Amelot A, Crespin M, Rendu F, Aiach M, Bachelot-Loza C. Polymorphonuclear leukocyte and monocyte activation induced by plasma from patients with heparin-induced thrombocytopenia in whole blood. *Thromb Haemost.* 2004;92:1411-9.
  
- Madjid M, Awan I, Willerson JT, Casscells SW. Leukocyte count and coronary heart disease: implications for risk assessment. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1945-56.



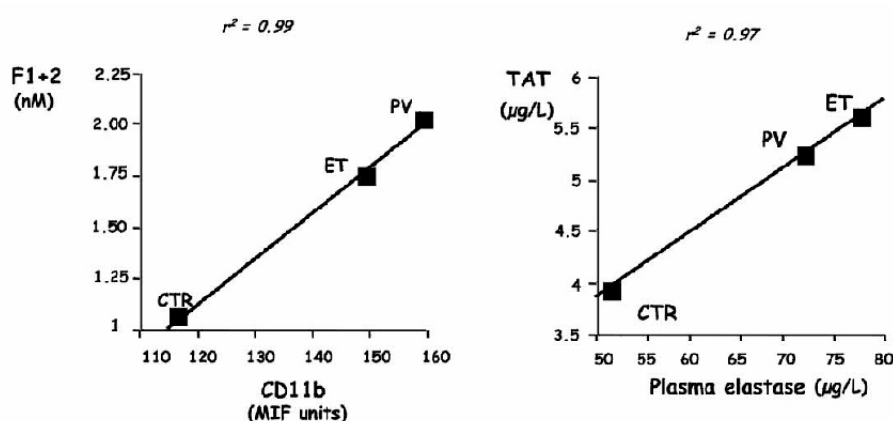
- Oudijk EJ, Nieuwenhuis HK, Bos R, Fijnheer R. Elastase mediated fibrinolysis in acute promyelocytic leukemia. *Thromb Haemost.* 2000;83:906-8
- Trujillo-Santos J, Di Micco P, Iannuzzo M, Lecumberri R, Guijarro R, Madridano O, Monreal M; RIETE Investigators. Elevated white blood cell count and outcome in cancer patients with venous thromboembolism. Findings from the RIETE Registry. *Thromb Haemost.* 2008;100:905-11.
- Wakefield TW, Myers DD, Henke PK. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:387-91.
- Wakefield TW, Strieter RM, Prince MR, Downing LJ, Greenfield LJ. Pathogenesis of venous thrombosis: a new insight. *Cardiovasc Surg.* 1997;5:6-15.

#### A.IV.6- Syndromes myéloprolifératifs, leucocytose et risque vasculaire

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des affections hétérogènes liées à la transformation d'une cellule souche hématopoïétique par un événement moléculaire qui procure un avantage prolifératif au clone sans trouble de la différenciation. Selon la lignée majoritairement atteinte, il est possible de distinguer plusieurs types de SMP ; nous nous consacrerons ici à la Thrombocythémie Essentielle (TE), où la prolifération concerne la lignée plaquettaire, et à la Polyglobulie de Vaquez (PV), où elle concerne la lignée érythroïde ; pathologies pour lesquelles la découverte de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> va probablement déboucher sur une redéfinition nosologique (voir annexe 1 pour une description plus complète de ces hémopathies).

Les patients atteints de TE ou de PV sont exposés à des complications vasculaires [Landolfi, 2006]. Un état d'hyperactivation plaquettaire et l'hyperviscosité sanguine sont les causes les plus évoquées. Plusieurs équipes ont étudié la fonctionnalité des PN dans ces pathologies. Même si les résultats sont parfois contradictoires, il apparaît que les PN dans ce contexte présentent des altérations du métabolisme oxydatif et que surtout, ceux-ci circulent à l'état activé [Cooper, 1972 ; Burgaleta, 2001]. Toutefois leur capacité d'exocytose des granulations semble préservée [Borregaard, 1993].

En 2000, l'équipe de Falanga aborde pour la première fois la question sous l'angle de l'hypercoagulabilité liée à ces hémopathies. Dans une population de 71 patients (34 PV et 37 TE) et comparativement à une population témoin en terme d'âge et de sexe, les auteurs ont pu montrer que les PN des patients se trouvent à l'état activé, avec surexpression de CD11b et phosphatase alcaline leucocytaire (PAL). Les PN montrent une réponse fonctionnelle réduite par rapport aux contrôles après stimulation *in vitro*. De même, le plasma des patients contient des concentrations significativement plus élevées d'élastase et de myéloperoxydase ; les auteurs concluent que ceci constitue les signes d'une dégranulation des PN *in vivo* et donc de leur activation. En outre, des marqueurs d'activation de la coagulation *in vivo* (D-dimères, complexes thrombine-antithrombine) et d'altérations endothéliales (thrombomoduline, facteur von Willebrand) ont été mesurés à des concentrations plus élevées que dans la population témoin, ceux-ci sont corrélés avec les paramètres choisis d'activation granulocytaire [Falanga, 2000] (figure 14). L'activation au vu des résultats présentés apparaît toutefois relativement modérée.



**Figure 14 : Corrélation entre les marqueurs d'activation granulocytaire et les marqueurs d'hypercoagulabilité entre les patients et les témoins (d'après Falanga, 2000)**

Jensen a ensuite mesuré un nombre élevé d'agrégats leuco-plaquettaire circulants (de type plaquette-polynucléaire/monocyte et plaquette/monocyte) chez des patients (17 PV et 15 TE). La présence de ces agrégats est de plus corrélée avec les antécédents de thromboses [Jensen, 2001]. D'autres équipes ont ensuite montré une élévation significative des agrégats plaquette/polynucléaire. Enfin, la présence de ce type d'agrégats est majorée après stimulation des PN au fMLP [Falanga, 2005].

Toutefois, au niveau clinique, la corrélation entre activation des PN et survenue de complications thrombotiques reste obscure. En revanche, le rôle de la mutation  $JAK2^{V617F}$  dans l'activation cellulaire est de plus en plus considérée [Brière, 2008]. Dans les PV, un effet du niveau d'expression du gène muté sur l'activation des PN (expression de la PAL membranaire) a été montré par Passamonti [Passamonti, 2006]. Dans les TE, Falanga a montré une différence entre TE mutées et non mutées, allant dans le sens d'une activation des cellules (plaquettes et polynucléaires) et d'une activation de la coagulation. Cependant, cette différence n'est réelle que pour certains marqueurs seulement, par exemple, ils n'ont mis en évidence aucune différence d'expression de CD11b entre TE mutée et non mutée [Falanga, 2007].

Toutes ces données sont des arguments pour imputer une contribution des PN dans la thrombogenèse des patients TE ou PV.

Cette notion est d'ailleurs largement reprise suite à la publication de travaux épidémiologiques rétrospectifs concluant que l'hyperleucocytose constitue un facteur de

risque indépendant d'accidents vasculaires, parfois au même titre que l'âge > 60 ans et l'existence d'antécédents :

- Wolanskyj a étudié une population de 322 patients atteints de TE. Ils ont montré que l'hyperleucocytose >15 G/L constitue un facteur prédictif indépendant du risque de thrombose artérielle. Ils ont pu stratifier la population en 3 groupes et ainsi montrer que la médiane de survie est la meilleure (25,2 ans) chez les patients de moins de 60 ans et avec une numération leucocytaire < 15 G/L, alors que cette médiane de survie n'est que de 10,3 ans chez les patients de plus de 60 ans et ayant une numération leucocytaire > 15 G/L [Wolanskyj, 2006].

- Carrobbio a corroboré les résultats précédents en étudiant 439 patients TE, chez qui 180 complications thrombotiques ont été répertoriées. Ils ont identifié qu'une numération leucocytaire > 8,7 G/L (médiane de l'hyperleucocytose notée dans leur population) constitue un facteur prédictif de risque de thrombose (sans spécificité pour les thromboses artérielles ou veineuses), tout en retrouvant les facteurs classiques, âge et antécédents. Les patients avec un faible risque (< 60 ans et sans antécédents) ayant des leucocytes > 8,7 G/L ont un risque équivalent aux patients avec un risque élevé (> 60 ans avec des antécédents vasculaires) et une numération leucocytaire normale. Il est aussi intéressant de noter que le traitement cytoréducteur par hydroxyurée a permis de baisser la numération leucocytaire, ce qui a abouti à une perte de significativité de l'association hyperleucocytose et thrombose [Carrobbio, 2007].

- Landolfi a étudié une population de 1638 patients atteints de PV, suivis pendant  $2,7 \pm 1,3$  ans et chez qui 205 thromboses ont été observées, et a montré qu'une hyperleucocytose supérieure à 15 G/L est associée significativement aux thromboses artérielles (IDM) par rapport à une leucocytose inférieure ou égale à 10 G/L [Landolfi, 2007].

- Tefferi [Tefferi, 2007] a comparé les seuils cités dans les études précédentes dans une population de 605 patients TE. Les thromboses artérielles au diagnostic étaient associées à une élévation de la numération leucocytaire (8,7, 10 ou 15 G/L) alors que les thromboses veineuses au diagnostic n'étaient associées qu'avec une hyperleucocytose > 15 G/L. Il faut surtout remarquer que, contrairement aux études précédentes, la numération leucocytaire au

moment du diagnostic ne prédit pas le risque de thrombose au cours de l'évolution [Tefferi, 2007].

- dans une étude plus récente, Carobbio a finalement montré que, dans une étude de 1063 patients TE, l'hyperleucocytose ( $>11\text{G/L}$ ) associée à une numération plaquettaire inférieure à 1000 G/L constitue une catégorie à haut risque vasculaire chez les patients, indépendamment des autres facteurs de risques classiques [Carobbio, 2008a].

*La figure 15 reprend les principaux résultats de plusieurs cohortes italiennes.*

Depuis d'autres études de cohortes plus ou moins grandes ont été publiées [Carobbio, 2008b ; Hsiao, 2007 ; Caramazza, 2009] soulignant toujours le lien entre leucocytose et événements vasculaires. Toutefois, toutes les études ne vont pas en ce sens. Notamment, Radaelli a étudié les facteurs de risque de complications thrombohémorragiques chez 306 patients atteints de TE et l'étude n'a mis en évidence aucune relation entre la numération leucocytaire et le risque vasculaire [Radaelli, 2007].

|                                                                          | Landolfi<br>et al. [7]       | Carobbio<br>et al. [8]     | Carobbio<br>et al. [9]        | Carobbio<br>et al. [11]   | De Stefano<br>et al. [10]                  |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------|
| Patients, n                                                              | 1,638                        | 439                        | 657                           | 1,063                     | 494 <sup>1</sup>                           |
| MPD type                                                                 | PV                           | ET                         | ET                            | ET                        | 235 ET, 259 PV                             |
| Thrombosis before/at diagnosis, n                                        | 587 (36%)                    | 113 (26%)                  | 151 (23%)                     | 193 (18%)                 | 281 (57%)                                  |
| Thrombosis at follow-up, n                                               | 169 (10%)                    | 67 (15%)                   | NA                            | NA                        | 166 (34%)                                  |
| Thrombotic events at follow-up, n                                        | 205                          | 78                         | 98                            | 118                       | NA                                         |
| Median follow-up, years                                                  | 2.7                          | 6.2                        | 4.5 (0–38)                    | 4.8 (0–38)                | 5.3 (0.1–26.2)                             |
| WBC count measured at                                                    | Diagnosis                    | Diagnosis                  | Diagnosis                     | Diagnosis                 | Thrombosis                                 |
| WBC count cut-off, $\times 10^9/\text{l}$                                | $>15$                        | $>8.7$                     | $>10$                         | $\geq 11$                 | $>12.4$                                    |
| WBC count reference category, $\times 10^9/\text{l}$                     | $\leq 10$                    | $<8.7$                     | $\leq 7.0$                    | $<8.0$                    | $<7.81$                                    |
| HR of multivariate baseline analysis (variables considered at diagnosis) |                              |                            |                               |                           |                                            |
| All major thrombotic events                                              | 1.24 (0.78–1.96)<br>p = n.s. | 2.3 (1.4–3.9)<br>p = 0.001 | 3.27 (1.54–6.95)<br>p = 0.002 | 2.0 (1.1–3.6)<br>p = 0.02 | 3.55 (1.02–12.25) <sup>2</sup><br>p = n.s. |
| Arterial thrombosis                                                      | 1.21 (0.69–2.11)<br>p = n.s. | NA                         | 3.12 (1.2–8.08)<br>p = 0.019  | NA                        | NA                                         |
| Myocardial infarction                                                    | 2.27 (1.0–5.15)<br>p < 0.049 | NA                         | 8.08 (1.0–65)<br>p = 0.05     | NA                        | NA                                         |
| Venous thrombosis                                                        | 1.28 (0.56–2.92)<br>p = n.s. | NA                         | 2.51 (0.86–7.29)<br>p = 0.092 | NA                        | NA                                         |

NA = Not available; WBC = white blood cells; HR = hazard ratio.  
<sup>1</sup> All with previous venous or arterial thrombosis.  
<sup>2</sup>  $\leq 60$  years old.

**Figure 15 : Résultats des études de plusieurs cohortes italiennes de patients atteints de syndromes myéloprolifératifs concernant l'association thrombose et leucocytose (d'après Marchetti & Falanga, 2009)**



## MEMO

*La Polyglobulie de Vaquez et la Thrombocytémie Essentielle sont des situations à haut risque vasculaire / thrombotique. Les PN pourraient constituer une des composantes majeures de cet état d'hypercoagulabilité. Ceux-ci circulent à l'état activés chez ce type de patients et les marqueurs d'activation granulocytaire sont assez bien corrélés avec ceux d'activation de la coagulation. Il est maintenant admis que l'hyperleucocytose à PN constitue un facteur de risque indépendant d'événements vasculaires / thrombotiques. Toutefois, aucune étude n'a montré le pouvoir procoagulant des PN dans ce contexte et les mécanismes par lesquels les PN contribueraient à la thrombogenèse au cours de ces hémopathies restent à élucider.*



## **Références**

- Brière J. Syndromes myéloprolifératifs : rôle des polynucléaires neutrophiles dans la prédiction du risque thrombotique. *Hématologie*. 2008;14 :285-90.
- Borregaard N, Kjeldsen L, Sengeløv H. Mobilization of granules in neutrophils from patients with myeloproliferative disorders. *Eur J Haematol*. 1993;50:189-99.
- Burgaleta C, González N, César J. Increased CD11/CD18 expression and altered metabolic activity on polymorphonuclear leukocytes from patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Acta Haematol*. 2002;108:23-8.
- Caramazza D, Caracciolo C, Barone R, Malato A, Saccullo G, Cigna V, Berretta S, Schinocca L, Quintini G, Abbadessa V, Di Raimondo F, Siragusa S. Correlation between leukocytosis and thrombosis in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol*. 2009 Feb 13.
- Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, Guerini V, Finazzi G, Rambaldi A, Barbui T. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*. 2008;26:2732-6.
- Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, Guerini V, Ruggeri M, Rodeghiero F, Rambaldi A, Barbui T. Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. *Blood*. 2008;112:3135-7.
- Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, Spinelli O, Delaini F, Marchioli R, Borrelli G, Rambaldi A, Barbui T. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood*. 2007;109:2310-3.
- Cooper MR, DeChatelet LR, McCall CE, Spurr CL. The activated phagocyte of polycythemia vera. *Blood*. 1972;40:366-74.

- Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, Manarini S, Finazzi G, Cerletti C, Barbui T. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2000;96:4261-6.
- Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2005;33:523-30.
- Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, Barbui T. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol*. 2007;35:702-11.
- Hsiao HH, Yang MY, Liu YC, Lee CP, Yang WC, Liu TC, Chang CS, Lin SF. The association of JAK2V617F mutation and leukocytosis with thrombotic events in essential thrombocythemia. *Exp Hematol*. 2007;35:1704-7.
- Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Increased circulating platelet-leukocyte aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. *Eur J Haematol*. 2001;66:143-51.
- Landolfi R, Cipriani MC, Novarese L. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: pathogenetic mechanisms and prevention. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19:617-33.
- Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R, Tognoni G, Marchioli R; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP). Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;109:2446-52.
- Marchetti M, Falanga A. Leukocytosis, JAK2V617F mutation, and hemostasis in myeloproliferative disorders. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2008;36:148-59.
- Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, Vanelli L, Arcaini L, Burcheri S, Malcovati L, Lazzarino M, Cazzola M. Relation between JAK2 (V617F)



mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;107:3676-82.

- Radaelli F, Colombi M, Calori R, Zilioli VR, Bramanti S, Iurlo A, Zanella A. Analysis of risk factors predicting thrombotic and/or haemorrhagic complications in 306 patients with Essential Thrombocythemia. *Hematol Oncol*. 2007;25:115-20.

- Tefferi A, Gangat N, Wolanskyj A. The interaction between leukocytosis and other risk factors for thrombosis in essential thrombocythemia. *Blood*. 2007;109:4105.

- Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc*. 2006;81:159-66.

## **B. OBJECTIFS**

Comme nous venons de l'aborder dans les chapitres bibliographiques précédents, l'étude de la contribution des polynucléaires neutrophiles dans l'hémostase au sens large n'est pas un sujet de préoccupation récent. De nombreuses études et auteurs ont montré que ces cellules majeures de l'inflammation peuvent interagir aussi bien avec les mécanismes de l'hémostase primaire et la formation du clou plaquettaire, que de la coagulation et de la fibrinolyse. Les résultats rapportés et le sens de cette implication ne sont pas unilatéraux et des données contradictoires subsistent, ce qui rend très délicate l'estimation globale du rôle de ces cellules et de leur impact dans l'hémostase : procoagulants par certains aspects (expression de facteur tissulaire, activation plaquettaire...), les PN peuvent dans le même temps avoir une action délétère sur les mécanismes (par production d'espèces réactives de l'oxygène, libération d'enzymes protéolytiques...), voire même profibrinolytique (par libération d'HNE principalement). C'est d'ailleurs à leur capacité à interagir avec la fibrinolyse que leur implication dans l'hémostase est parfois réduite. Pourtant, même s'il semble clair que le PN puisse potentiellement influencer sur la coagulation et la génération de thrombine, aucun élément précis n'est disponible à ce jour sur l'impact global de leur action sur ces mécanismes.

L'appréciation de leur retentissement sur la coagulation est d'autant plus ardue qu'il existe très peu de dispositifs expérimentaux permettant d'étudier le processus dans sa globalité, et surtout d'objectiver à la fois une hyper- ou une hypocoagulabilité.

***L'objectif de ce travail est d'évaluer l'impact des PN sur la coagulation, de la génération de la thrombine à la constitution du réseau de fibrine, à l'aide de méthodes d'étude des mécanismes aussi intégratives et globales que possible.***

Nous aborderons la problématique sous différents angles :

- étudier l'influence de PN issus de sujets sains sur la constitution du caillot ou la génération d'activité thrombinique en milieu plasmatique.
- étudier spécifiquement l'action des 2 sérine-protéases granulocytaires, Cath G et HNE, depuis longtemps évoquées comme pouvant au moins en partie expliquer l'action des PN sur ces mécanismes, avec les mêmes méthodes d'exploration.
- enfin, étudier, à travers une étude clinique, le potentiel procoagulant des PN chez des patients atteints de syndromes myéloprolifératifs avec présence de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> afin de documenter la relation leucocytose / thrombose récemment évoquée dans ce contexte\*.

Pour satisfaire à ces objectifs, nous avons choisi d'utiliser 2 méthodologies complémentaires d'études globales de la coagulation : d'une part la thromboélastométrie par l'intermédiaire du dispositif ROTEM® et d'autre part le test de génération d'activité thrombinique grâce au dispositif CAT®. Ces méthodes ont, comme nous le détaillerons ci-après, l'avantage de permettre d'apprécier aussi bien les tendances pro- qu'anticoagulantes. Ceci les rend donc particulièrement attractives pour le but de ce travail.

\* dans le cadre du Prix de Recherche Clinique 2007 du CHU de Nancy

*« Evaluation de la contribution des polynucléaires dans la thrombogenèse au cours des syndromes myéloprolifératifs JAK2 positifs »*

# **C. TRAVAIL EXPERIMENTAL**

## **C.I. Méthodes**

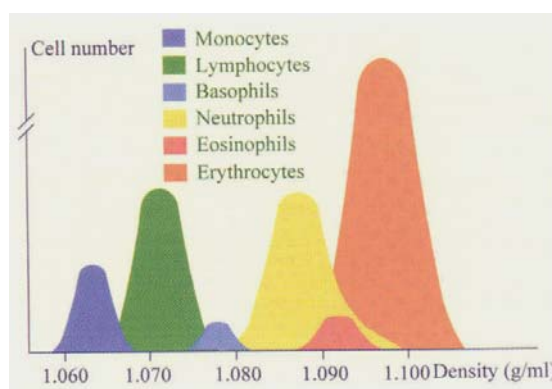
## C.I.1- Obtention de populations leucocytaires / Séparation des PN / Validation de la procédure

### C.I.1.1 Procédure de séparation des polynucléaires à partir de sang total

Pour pouvoir étudier l'implication et l'influence potentielles des PN dans la coagulation, il est impératif de disposer de population cellulaire très bien individualisée contenant la plus faible contamination possible en plaquettes et en monocytes, qui sont deux types cellulaires intervenant dans les mécanismes de la coagulation. Il existe différentes méthodes d'isolement des leucocytes plus ou moins rapides et coûteuses : adhérence sur verre ou plastique (en particulier, pour les monocytes), utilisation d'anticorps spécifiques, cytométrie en flux couplée à un séparateur de cellules, gradient de densité.

Cette dernière méthode est extrêmement répandue dans les travaux étudiant des cellules issues de milieux biologiques et notamment des leucocytes.

Les cellules seront séparées en fonction de leur densité sur un gradient constitué de sucres (figure 16).



**Figure 16 : Densité des cellules sanguines**

Initialement, les puretés de fractions cellulaires obtenues avec les premiers gradients commercialisés se situaient aux alentours de 80-90%. Mais des ajustements au niveau des molécules de sucres utilisées et de l'osmolarité ont permis d'obtenir des milieux plus spécifiques de certaines populations cellulaires avec des performances améliorées [Bøyum, 1991].

De nombreux gradients différents sont ainsi disponibles, nous avons choisi d'utiliser le Polymorphprep®. En effet, celui-ci est réputé être spécifiquement adapté à l'isolement des polynucléaires. Préalablement, ce milieu a fait l'objet d'études et de comparaisons avec d'autres gradients afin de définir ces performances générales d'isolement et des conditions

opératoires optimales, adaptées à notre laboratoire, ont pu être établies [Oudot, 2003]. Ces travaux préliminaires ont montré de bonnes performances de cette procédure.

#### **C.I.1.11 Matériel et réactifs**

##### **☒ Système de prélèvement sanguin :**

Vacutainer® (Becton Dickinson) (anticoagulant : citrate de sodium, 0,129 M)

Monovette® (Sarstedt) (anticoagulant : citrate de sodium, 0,106 M)

##### **☒ Centrifugeuse Minifuge T (Heraeus)**

##### **☒ Centrifugeuse GR 422 (Jouan)**

##### **☒ Automate ADVIA 2120 (Siemens)**

##### **☒ pHmètre Ph-850 (TACUSSEL)**

##### **☒ Cytomètre en flux FACSCalibur (Becton Dickinson)**

##### **☒ Lames en verre pour frottis sanguin**

##### **☒ Cytospin3 (Shandon)**

##### **☒ Microscope BH-2 (Olympus)**

##### **☒ Tubes en verre 12 mL**

##### **☒ Tubes en plastique 5 et 10 mL**

##### **☒ Tubes TruCOUNT (Becton Dickinson)**

☒ **Solution Stock I** : NaCl 16 g ; KCl 0,4 g ; NaHCO<sub>3</sub> 2 g ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,09 g ; Eau purifiée qsp 100 mL

☒ **Solution Stock II** : MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O 2,03 g ; Eau purifiée qsp 100 mL

☒ **Tampon Tyrode glucosé pH=7,4** : Glucose 0,17 g ; Solution Stock I 5 mL ; Solution Stock II ; 5 mL ; Hepes 1 M (Sigma) 0,5 mL ; Eau purifiée qsp 100 mL  
Ajustement à pH=7,4 avec HCl ou NaOH 1 M

☒ **Polymorphprep** ® (AXIS-Shield PoC AS) : Dextran 500 8,0 % ; Sodium diatrizoate 13,8 %

☒ **Solution NH<sub>4</sub>Cl à 0,87%** : NH<sub>4</sub>Cl 0,87 g ; Eau purifiée 100 mL

☒ **May Grünwald** : Poudre de May Grünwald 5 g ; Méthanol (CH<sub>3</sub>OH) qsp 1L

☒ **Giemsa** (solution mère à diluer) : Colorant de Giemsa en poudre 0,75 g ; Méthanol 65 mL ; Glycérine 65 mL

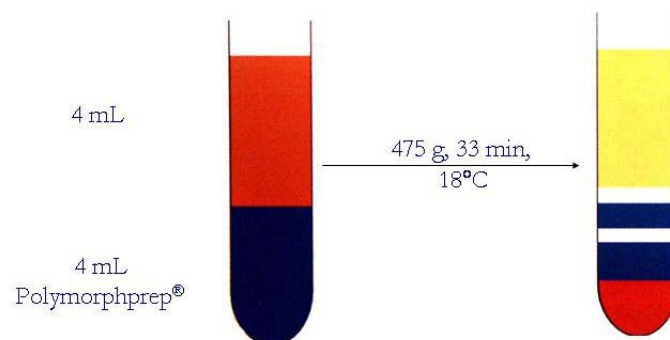
☒ **Tampon** (pour coloration MGG) : Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 15 g ; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5 g ; Eau distillée qsp 5000 mL

☒ **Ac anti CD 41-PE** (IMMUNoTECH, clone P2)



#### **C.I.1.12 Protocole de séparation**

- **Prélèvement antécubital de sang total** veineux anticoagulé par du citrate de sodium issu de volontaires sains (donneurs à l'Etablissement Français du Sang Lorraine Champagne par convention), n'ayant pas pris de traitement médicamenteux connu pour interférer avec l'hémostase ou les polynucléaires et ayant signé un consentement éclairé.
- **Elimination des plaquettes** par centrifugation à 172g, pendant 10 min, à 20°C, frein 2  
Obtention d'un surnageant, constitué de plasma et de plaquettes en grande quantité (plasma riche en plaquettes PRP), qui sera retiré par aspiration jusqu'à 2 mm au dessus du culot et conservé pour la suite des tests (préparation de plasma pauvre- et -dépourvu en plaquettes),
- **Ajout de Tyrode glucosé** pour obtenir le même volume de sang qu'initialement (soit 4,5 mL) puis homogénéisation par retournements lents
- **Dépôt du sang sur Polymorphprep® :**  
Dans un tube de 12 mL en verre, on dépose successivement 4 mL de Polymorphprep® puis 4 mL d'échantillon, en prenant garde de ne pas mélanger les deux phases
- **Séparation des populations cellulaires** par centrifugation à 475g, pendant 33 min, à 18°C, frein 2 : obtention de deux anneaux distincts et d'un culot d'érythrocytes (figure 17)



**Figure 17 : Isolement sur Polymorphprep®**

- **Prélèvement de l'anneau inférieur** contenant les PN dans un tube plastique transparent de 10 mL et rajout de Tyrode qsp 10 mL
- **Lavage** par centrifugation à 400g, pendant 10 min, à 20°C, frein 7  
Obtention d'un culot cellulaire et d'un surnageant qui sera éliminé
- **Lyse des érythrocytes résiduels** par mise en contact du culot pendant 15min à température ambiante avec une solution de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à 0,87%
- **Centrifugation** à 400g, pendant 10 min, à 20°C, frein 7  
Elimination du surnageant
- **Reprise du culot dans 10 mL de Tyrode glucosé puis lavage** comme précédemment  
Elimination du surnageant
- **Resuspension du culot** dans du Tyrode glucosé ou du plasma autologue en fonction des protocoles expérimentaux détaillés ci-après.

#### ***C.I.1.13 Préparation de plasma dépourvu en plaquettes***

A partir du PRP obtenu après la 1<sup>ère</sup> centrifugation de sang total :

- centrifugation du PRP à 2000g, pendant 10 minutes à 20°C
- retrait du surnageant (plasma pauvre en plaquettes – PPP)
- ultracentrifugation du PPP à 13000 g, pendant 30 minutes à 4°C
- récupération du plasma dépourvu en plaquettes et en phospholipides procoagulants (microvésicules) – PDP

#### ***C.I.1.14 Préparation de plasma riche en plaquettes***

Le PRP issu de la 1<sup>ère</sup> centrifugation de sang total est récupéré et fait l'objet d'une numération plaquettaire (par automate ADVIA 2120<sup>®</sup>, Siemens). Il sera ensuite ajusté à 150 G/L en plaquettes par dilution dans du PDP autologue et conservé à température ambiante pour la suite des tests.

### C.I.1.2 Détermination de la pureté des suspensions de polynucléaires obtenues

Chaque isolat a fait systématiquement l'objet d'un comptage cellulaire avec automate hématimètre (ADVIA 2120<sup>®</sup>, Siemens), et ce avant toute manipulation ultérieure, afin d'une part, de s'assurer de la bonne séparation des PN des leucocytes mononucléés, d'autre part d'ajuster la concentration en PN mais également afin d'évaluer la contamination plaquettaire résiduelle. Certains isolats ont fait l'objet d'un étalement sur lame par Cytospin3<sup>®</sup>, puis d'une coloration au MGG [GBEA service d'hématologie biologique, CHU Nancy] ; un comptage au microscope optique a été réalisé pour vérifier la répartition des populations leucocytaires. De même, certains isolats, pour lesquels il existe une discordance entre le nombre de plaquettes et les différents paramètres plaquettaires calculés par hématimétrie (principalement volume plaquettaire moyen et graphiques de répartition cellulaire), ont fait l'objet d'un comptage des plaquettes résiduelles en cytométrie en flux (CMF) [GBEA hématologie biologique, CHU Nancy].

#### **Critères primaires de sélection des isolats**

*Polynucléaires totaux > 95 %*

*Rapport polynucléaires / plaquettes > 1*

#### **C.I.1.21 Numération ADVIA 2120<sup>®</sup>**

1) Système Vacutainer<sup>®</sup> (N = 35) :

- *Leucocytes* :  $20,6 \pm 12,8$  G/L
  - *PN* =  $96,5 \pm 1,4$  %
- *Plaquettes* :  $5,5 \pm 4,4$  G/L
- *Rapport polynucléaires / plaquette* = 5 / 1 en moyenne

2) Système Monovette<sup>®</sup> (N = 12) :

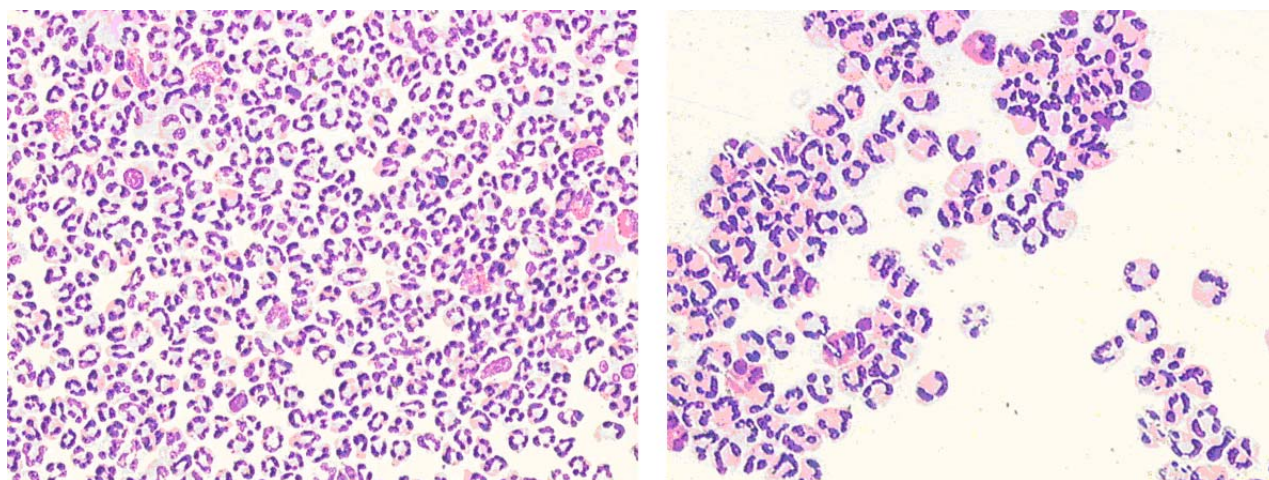
- *Leucocytes* :  $19,0 \pm 1,4$  G/L
  - *PN* =  $97,2 \pm 1,4$  %
- *Plaquettes* :  $5,6 \pm 1,4$  G/L
- *Rapport polynucléaires / plaquette* = 5 / 2 en moyenne

### ***C.I.1.22 Formule leucocytaire au microscope après étalement par Cytospin3®***

Réalisée sur 11 isolats (tubes Vacutainer®)

$$\left. \begin{array}{l} PN : 92,4 \pm 4,3 \% \\ PE : 4,5 \pm 3,6 \% \\ PB : 0,1 \pm 0,2 \% \end{array} \right\} \text{ moyenne PN totaux} = 97 \%$$

Monocytes :  $1,0 \pm 0,6 \%$   
Lymphocytes :  $2,0 \pm 1,1 \%$



**Figure 18 : Isolats de PN après étalement par Cytospin3® et coloration MGG (Gauche) grossissement x 100 ; (Droite) grossissement x 400**

### ***C.I.1.23 Evaluation de la contamination plaquettaire***

#### ***Paramètres discordants***

Certains résultats obtenus par hématimétrie affichent parfois un nombre relativement élevé de plaquettes (>40 G/L en général) alors que les graphiques de répartition montrent peu d'éléments dans la zone théorique des plaquettes. De plus, on note que pour ces isollements, le volume plaquettaire moyen (VPM) est très élevé, souvent supérieur à 15 fL (normale entre 7 et 11 fL). Ceci peut provenir d'une interférence avec de petits éléments pouvant correspondre à des débris cellulaires (par exemple, débris de globules rouges suite à l'étape de lyse). Ainsi, la numération plaquettaire sera vérifiée en CMF afin de valider la qualité de l'isolement et de s'assurer que la contamination plaquettaire est acceptable (tableau 6).

Cytométrie en flux (N=4, tubes Vacutainer®)

**Tableau 6 : Comparaison de la numération plaquettaire par hématimétrie et par CMF**

| Isolats                                       | 1  | 2  | 3   | 4   |
|-----------------------------------------------|----|----|-----|-----|
| Comptage par hématimétrie<br>ADVIA 2120 (G/L) | 45 | 84 | 71  | 147 |
| Comptage en CMF (G/L)                         | 1  | 5  | 2,4 | 3,7 |

#### ***C.I.1.24 Evaluation de la contamination monocyttaire***

Concernant les monocytes, la littérature fait état que leur présence, au-delà de 3 % dans une suspension de PN, peut rendre délicate l'interprétation de tests de coagulation [Hair, 1996]. Les isolats contenant en moyenne 1 % de monocytes, la contamination est donc acceptable.

#### ***C.I.1.25 Conclusion***

Les différents paramètres montrent que ce protocole sépare bien les PN et que les isolats contiennent très peu de plaquettes et de monocytes.

Une attention particulière sera toutefois portée aux valeurs brutes après numération afin de distinguer les artefacts de comptage des contaminations vraies par les plaquettes et les monocytes.

#### **C.I.1.3 Vérification de la fonctionnalité et de la réactivité des PN après isolement**

Afin de s'assurer que la procédure d'isolement n'altère pas la fonctionnalité des PN, nous avons utilisé certains isolats afin d'évaluer leur état immédiatement après isolement ainsi que leur bonne réactivité et ce, par 2 techniques complémentaires :

- *Etude de la production d'espèces réactives de l'oxygène par chimiluminescence*
- *Etude de l'expression de marqueurs de surface en cytométrie de flux*

### ***C.I.1.31 Etude de la production d'espèces réactives de l'oxygène par chimiluminescence***

#### ***C.I.1.311 Principe***

Après stimulation par divers agonistes, les polynucléaires neutrophiles augmentent de façon considérable leur métabolisme oxydatif, afin de générer des dérivés de l'oxygène hautement réactifs et toxiques pour les micro-organismes. Leur production peut être détectée à l'aide de molécules particulières tel que le luminol. Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) ainsi produites stimulent le luminol qui émet des flashes lumineux mesurés par chimiluminescence à 37°C.

Ce test a ici 2 objectifs :

- vérifier l'absence de production d'EROs par les PN fraîchement isolés, en l'absence de toute stimulation par un agoniste
- vérifier la bonne réactivité des PN par la production d'EROs après stimulation par divers agonistes

Pour ces tests nous utiliserons 2 agonistes bien établis du PN : le Phorbol 12-myristate 13-acétate et le Zymosan opsonisé.

#### ***Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA)***

Appartenant à la famille des esters de phorbols, le PMA est un activateur artificiel des PN. Hautement lipophile, il est capable de pénétrer dans la cellule et d'induire l'explosion oxydative sans entraîner la machinerie phagocytaire [Lunardi, 1996] : il agit directement au niveau intracellulaire en stimulant la protéine kinase C (PKC) qui permet l'activation de la NADPH oxydase. La NADPH oxydase fonctionnelle permet alors la formation d'espèces réactives de l'oxygène (EROs).

#### ***Zymosan opsonisé***

Le zymosan opsonisé est un stimulus particulière, donc plus physiologique que le PMA. Il est entouré d'opsonines, ce qui permet la phagocytose par le PN et déclenche ainsi l'explosion oxydative.

### C.I.1.312 Matériel et réactifs

☒ **Fluoroskan Ascent FL** (Thermo).

☒ **Microplaques** à fond plat, blanches et sécables (Thermo).

☒ **Luminol** : 5 Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazinédione. (Sigma)

Solution mère à  $10^{-2}$  M (dans DMSO), conservée à +4°C, à l'abri de la lumière.

Préparation extemporanée : solution de travail à  $10^{-4}$  M (dans Tyrode).

☒ **PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acétate** (Sigma)

Solution mère à 100 µg/L (dans DMSO), conservée à -80°C.

Préparation extemporanée : solution de travail à 10 µg/L (dans Tyrode)

☒ **Zymosan opsonisé** (Sigma)

Préparation : mettre en suspension le zymosan A dans du sérum groupe AB, placer au bain marie avec agitation, puis centrifuger et éliminer le surnageant, remplacé par un tampon. Solution de travail à 15 mg/mL. Conservation à -20°C.

### C.I.1.313 Plan expérimental

Les PN fraîchement isolés seront resuspendus dans du tampon Tyrode glucosé pH=7,4 et immédiatement utilisés après ajustement à 5 G/L ou 10 G/L, pour étude en chimiluminescence comme suit :

**Tableau 7 : Plan expérimental d'étude de la réactivité des isolats de PN en chimiluminescence**

|          | <b>Luminol</b><br><b><math>10^{-4}</math> M</b><br>(µL) | <b>PN</b><br><b>5 ou 10 G/L</b><br>(µL) | <b>PMA</b><br><b>(10 µg/L)</b><br>(µL) | <b>Zymosan</b><br><b>opsonisé</b><br><b>(15 mg/mL)</b><br>(µL) | <b>Tyrode glucosé</b><br><b>pH 7,4</b><br>(µL) |
|----------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>1</b> | 245                                                     | 35                                      | 70                                     |                                                                |                                                |
| <b>2</b> | 245                                                     | 35                                      |                                        | 70                                                             |                                                |
| <b>3</b> | 245                                                     | 35                                      |                                        |                                                                | 70                                             |

Le critère de jugement sera uniquement qualitatif (production ou non d'EROs) et non quantitatif.

### C.I.1.314 Résultats (N= 5)

Quelle que soit leur concentration, les PN natifs, en l'absence de toute stimulation, ne produisent aucun pic en chimiluminescence, indiquant donc qu'ils ne génèrent aucun EROs après la procédure d'isolement.

En revanche, après stimulation par l'un ou l'autre des agonistes, un pic est détecté en chimiluminescence, indiquant la bonne réactivité des PN à produire des EROs (figure 19).

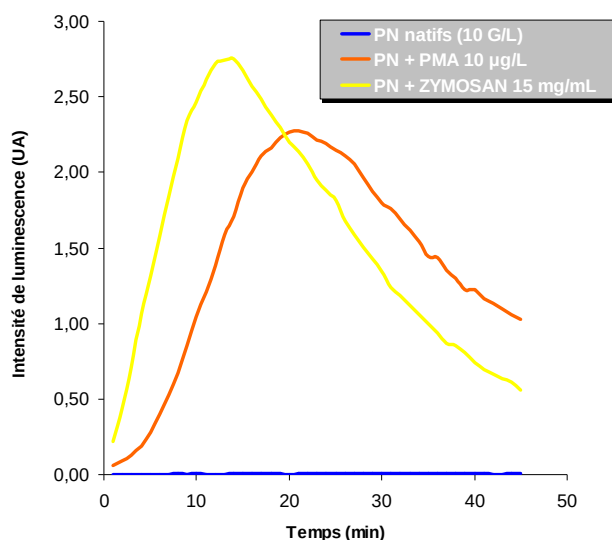


Figure 19 : Réactivité des isolats de PN en chimiluminescence

### C.I.1.32 Etude de l'expression de marqueurs de surface en cytométrie de flux

#### C.I.1.321 Principe

Ces expérimentations permettent la mesure de l'expression des sites antigéniques CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD62L par cytométrie en flux grâce à une technique d'immunomarquage indirect à la surface des polynucléaires neutrophiles. En effet, l'expression de ces marqueurs est modifiée selon l'état d'activation des PN et les variations sont bien déterminées [Latger-Cannard, 2000].

Pour ces expérimentations, nous utiliserons comme agonsite des PN, le fMLP, qui est un peptide synthétique qui mime les membranes de bactéries grâce au groupement formyl terminal rattaché au peptide. De ce fait, il se fixe sur un récepteur à 7 domaines transmembranaires des PN, ce qui entraîne une cascade de signaux intracellulaires aboutissant à la stimulation de la protéine kinase C et donc à l'activation de la NADPH oxydase.



*C.I.1.322 Matériel et réactifs*

- ☒ **Cytomètre en flux FASCalibur** (Becton Dickinson).
- ☒ **Tubes à hémolyse** pour cytomètre.
- ☒ **Centrifugeuse Multifuge 3 L-R** (Heraeus)
- ☒ **fMLP** : N-formyl-Met-Leu-Phe. (Sigma)  
Solution mère à  $10^{-2}$  M (dans DMSO), conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ .  
Préparation extemporanée : solution de travail à  $10^{-5}$  M final.
- ☒ **Anti-IgG1** (Beckman Coulter) : contrôle négatif isotypique.  
Prêt à l'emploi.
- ☒ **Anticorps monoclonaux anti-humains et non marqués**:  
Anti-CD11a, Anti-CD11b, Anti-CD11c, Anti-CD18. (Beckman Coulter). Prêts à l'emploi.  
Anticorps Anti-CD62L (clone DREG-56) (Becton Dickinson). Prêt à l'emploi.
- ☒ **Anticorps secondaire couplé à la FITC** (Dako) Prêt à l'emploi.
- ☒ **Solution de lavage de cellules** CellWASH (Becton Dickinson).

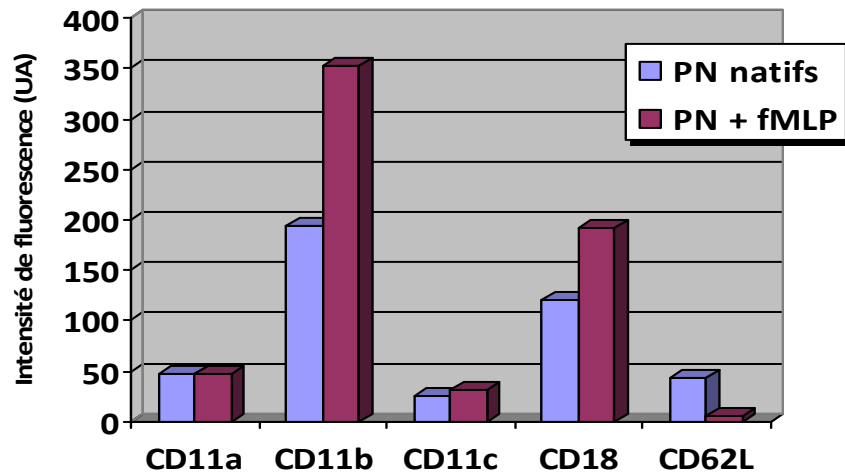
*C.I.1.323 Protocole [adapté du GBEA Nancy]*

- A partir d'un **isolat de PN à 5 G/L**, préparation de 6 tubes avec chacun **100  $\mu\text{L}$  de PN natifs** et 6 tubes chacun avec **100  $\mu\text{L}$  de PN et 1  $\mu\text{L}$  de fMLP** ( $2 \cdot 10^{-5}$  M)
- **Incuber 15 min à  $37^{\circ}\text{C}$**  les 6 tubes contenant PN et fMLP.
- Dans chaque tube, ajout de **20  $\mu\text{L}$  d'anticorps** (Anti-IgG1 (contrôle isotypique), anti-CD11a, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD18, anti-CD62L)
- **Incuber 45 min à  $4^{\circ}\text{C}$ .**
- **Ajout de solution CellWASH** (2 mL)
- **Lavage** par centrifugation à 300g, 5 min à température ambiante. Elimination du surnageant. Ajout de 2 mL de solution CellWASH
- **2<sup>ème</sup> lavage** par centrifugation à 300g, 5 min. Elimination du surnageant.
- Ajout dans chaque tube **100  $\mu\text{L}$  d'anticorps secondaire** couplé au FITC.
- **Incuber 30 min à  $4^{\circ}\text{C}$ .**
- **Lavage** par centrifugation à 300g, 5 min. Elimination du surnageant.
- **Ajout de CellWASH** (500  $\mu\text{L}$ ) dans chacun des 12 tubes.
- **Lecture avec cytomètre en flux FASCalibur.**

**C.I.1.324 Résultats (N=4)**

Après stimulation des PN, on note que (figure 20) :

- l'expression de CD11a ne varie quasiment pas,
- l'expression de CD11b, CD18 augmente clairement
- l'expression de CD11c augmente légèrement
- l'expression de CD62L, diminue nettement



**Figure 20 : Réactivité des isolats de PN en cytométrie de flux**

Ces données sont cohérentes avec les données de la littérature [Latger-Cannard, 2000] et montrent que les PN ont été clairement activés par le fMLP.

*NB : Ces tests sont uniquement réalisés à partir des isolats issus de sang total prélevé avec le système S-Monovette®. En effet, concernant le système BD Vacutainer, ces travaux ont été réalisés précédemment dans notre laboratoire, avec des résultats similaires [Sennoun, 2004].*

#### **C.I.1.4 Conclusion**

Quel que soit le système de prélèvement utilisé Vacutainer® ou Monovette®, la procédure d'isolement permet une très bonne séparation des PN (> 96 %), avec une contamination minime par les cellules intervenant dans la coagulation (plaquettes et monocytes).

De plus, cette procédure n'altère pas de façon majeure les cellules. Les expérimentations réalisées en CMF et chimiluminescence montrent que les cellules ne sont pas activées après séparation et qu'elles sont toujours bien fonctionnelles et activables au moment où seront réalisés les essais décrits dans les parties suivantes.

## **Références**

- Bøyum A, Løvhaug D, Tresland L, Nordlie EM. Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. *Scand J Immunol.* 1991;34:697-712.
- GBEA CHU Nancy. Service Hématologie Biologique. Mesure des peroxydes des polynucléaires par chimiluminescence.
- GBEA CHU Nancy. Service Hématologie Biologique. Quantification des récepteurs d'adhérence des polynucléaires par cytométrie en flux.
- Latger-Cannard V, Regnault V, Lecompte T, Stoltz JF. Mesure des récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile. Influence des paramètres pré-analytiques. *J Mal Vasc.* 2000;25.3:181-186.
- Latger-Cannard V, Regnault V, Lecompte T. Utilisation d'un calibrateur pour quantifier les récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile par cytométrie en flux. *Ann Biol Clin (Paris).* 2000;58:337-343.
- Lunardi F, Cavalcante Lima JH., Assnay I. Comparative study of respiratory burst induced by phorbol ester and zymosan in human granulocytes. *Clin Biochem.* 2006 ;39:78-85.
- Rabesandratana H. Exploration des cellules phagocytaires sanguines en cytométrie en flux. *Revue Française Des Laboratoires*, 1996, N° 287.
- Oudot A. Mise au point des protocoles de préparation d'isolats leucocytaires (Polynucléaire neutrophile, monocyte, lymphocyte) en vue de leur étude en tant que substrat de l'hémostase. Mémoire « Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie » Université Henri Poincaré, Nancy-1, 2003.
- Sennoun N. Mise en évidence de la contribution des polynucléaires neutrophiles dans le processus de la coagulation. Mémoire « DEA Bioingénierie – Biomatériaux », Henri Poincaré Nancy 1, INPL, 2004.

## C.I.2- Thromboélastométrie

La thromboélastographie (TEG) / thromboélastométrie (TEM) est une méthode ancienne d'étude globale de la coagulation, décrite dès 1948 par Hartert [Luddington, 2005]. Elle permet l'enregistrement des modifications visco-élastiques du plasma ou du sang citratés après déclenchement de la coagulation par recalcification, facilitée ou non par des activateurs. Elle fournit ainsi une représentation graphique globale du processus de polymérisation du réseau de fibrine.

Cette méthode, quelque peu tombée en désuétude, a bénéficié d'un regain d'intérêt depuis plusieurs années grâce au développement d'appareillages modernisés tel que le ROTEM® (Diagnostica Stago).

Le ROTEM® est un appareil semi-automatisé basé sur le principe de la thromboélastométrie : les échantillons, sanguins ou plasmatiques et anticoagulés de façon adéquate, ainsi que les réactifs, sont prélevés au moyen d'une pipette électronique automatisée permettant une standardisation des mesures et une facilitation des procédures. Ses avantages sont les suivants : les données sont continues et numérisées, ce qui permet leur stockage sur support informatique, mais également le calcul de nombreux et parfois nouveaux paramètres, tels que la courbe dérivée première (dite courbe de vélocité) permettant d'obtenir des informations sur la dynamique de formation du caillot. De plus, il est possible d'étudier jusqu'à 4 échantillons simultanément.

En pratique :

Les échantillons ainsi que les réactifs sont dispensés dans une cupule en plastique, maintenue dans un porte-cupule aimanté et thermostaté à 37°C. Un cylindre en plastique est relié à un axe rotatif. Cet axe est doté d'un mouvement pendulaire alternatif ( $\pm 4,75^\circ$ ). Les mouvements de l'axe sont guidés par un roulement à bille et sont insensibles aux vibrations externes (contrairement aux anciens appareils). Ces mouvements sont détectés par un système optique et leurs variations sont numérisées. Après déclenchement de la coagulation, le cylindre est plongé dans la cupule. Lors de la formation du caillot, la résistance au mouvement de l'axe, du fait de la polymérisation du réseau de fibrine, est enregistrée et convertie en temps réel en un graphique appelé TEMogram (figure 21).

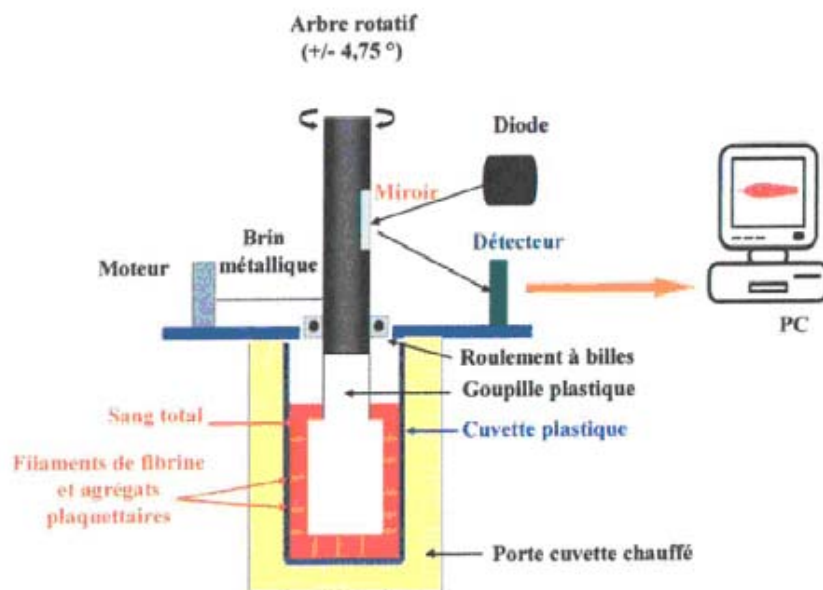
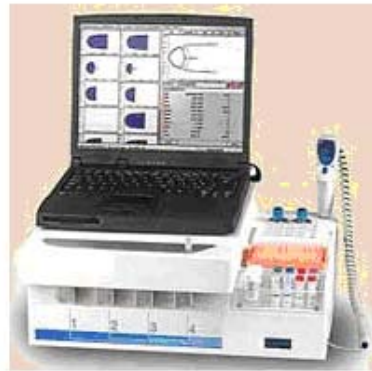


Figure 21 : Dispositif ROTEM et principe de la thromboélastométrie (d'après Bauters, 2007)

Il existe de nombreux paramètres déterminés à partir du TEMogram ainsi obtenu ; paramètres dont la pertinence et l'utilité n'est pas toujours clairement définie.

Nous avons choisi de prendre en compte les paramètres les plus courants et les plus robustes (figure 22).

- Temps de coagulation (CT, Clotting Time) : temps écoulé (exprimé en seconde) depuis le déclenchement de la réaction jusqu'à l'obtention d'une fermeté du caillot de 2 mm, défini comme étant le début de la coagulation.
- Vitesse de formation du caillot (CFT, Clot Formation Time) : intervalle de temps écoulé (exprimé en seconde) entre le CT et l'obtention d'un caillot de fermeté de 20 mm. Le CFT décrit la phase suivante de la coagulation : la formation d'un caillot stable grâce aux plaquettes activées et à la fibrine.

- Fermeté maximale du caillot (MCF, Maximum Clot Firmness) : amplitude maximale du caillot (en millimètre), avant fibrinolyse.
- MCF-t : temps (exprimé en seconde) pour obtenir la fermeté maximale du caillot.
- Angle alpha : angle (exprimé en degré) mesuré entre la ligne de base au CT et la tangente de la courbe.

De nouveaux paramètres ont été proposés depuis quelques années, en analysant la courbe dérivée du TEMogram [Sorensen, 2003]. Ceux-ci fournissent des informations sur la dynamique et la cinétique de la formation du caillot :

- Aire sous la courbe (AUC, Area under first derivative curve).
- Maximum de la dérivée première (MaxVel ou MAXV) : représente la vitesse maximale de la formation du caillot, reporté en mm/min.
- t-MaxVel (ou MAXV-t) : temps (exprimé en seconde) pour obtenir MaxVel.

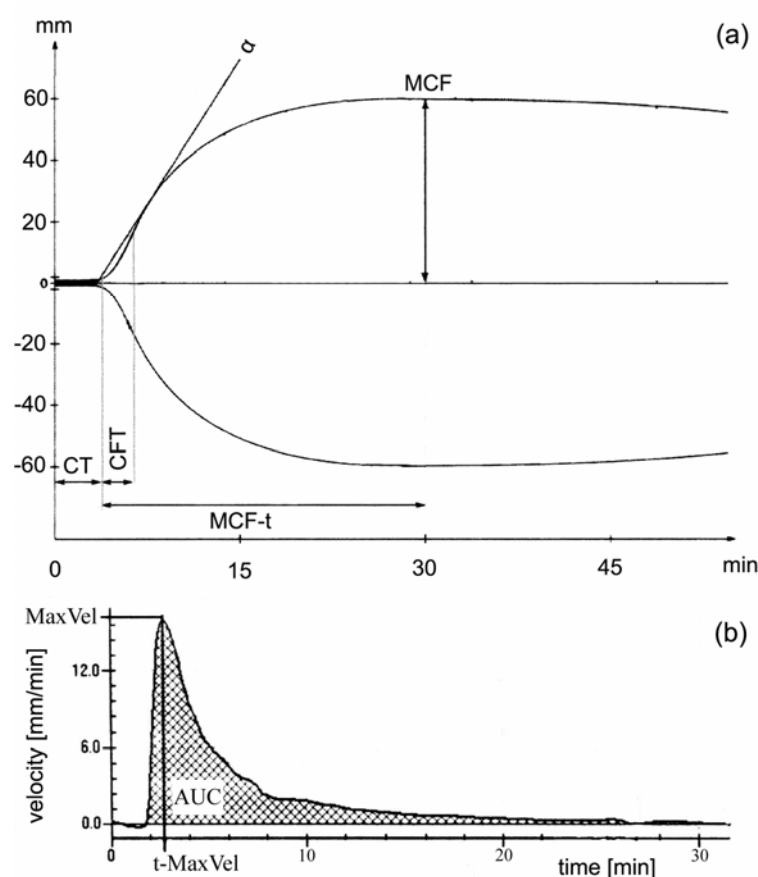


Figure 22 : Paramètres ROTEM® issus de la courbe primaire (haut) et dérivée première (bas)

Le ROTEM® est associé à une gamme de réactifs et de tests spécifiques, permettant d'explorer une phase ou des acteurs précis de la formation du caillot (voie du facteur tissulaire, voie intrinsèque, contribution des plaquettes,...) [Savry, 2005].

Nous avons retenu 2 tests pour cette étude :

- NATEM® dans lequel la coagulation n'est déclenchée que par recalcification simple.
- INTEM®, dans lequel la coagulation est déclenchée par activation standardisée de la voie intrinsèque, par l'acide ellagique en présence de phospholipides et recalcification.



## **Références**

- Bauters A, Mazoyer E. Apport de la thromboélastométrie rotative (Rotem®) pour l'exploration de l'hémostase: Intérêt en pratique clinique. Rev Fran Lab. 2007;393:45-50.
- Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry. Clin Lab Haematol. 2005;27:81-90.
- Savry C, Quinio P, Lefèvre F, Schmitt F. Maniabilité et intérêts potentiels du thromboélastomètre modifié (Rotem™) dans le monitoring extemporané en réanimation. Ann Fr Anesth Reanim. 2005;24:607-16.
- Sorensen B, Johansen P, Christiansen K, Woelke M, Ingerslev J. Whole blood coagulation thrombelastographic profiles employing minimal tissue factor activation. J Thromb Haemost. 2003;1:551-8.

### **C.I.3- Thrombinographie et méthode CAT®** [Hemker, 2002 ; Hemker, 2003 ; Lecompte, 2006 ; Baglin, 2005]

La thrombinographie est une méthode d'étude *in vitro* de la génération d'activité thrombinique au cours du temps après déclenchement de la coagulation par une faible quantité de facteur tissulaire (de l'ordre de quelques pM). Elle ne doit pas être confondue avec les méthodes d'études de génération de thrombine *in vivo*, basées sur la mesure des concentrations plasmatiques de certains marqueurs d'activation de la coagulation (fragments 1+2 de la prothrombine, D-dimères, ...).

La thrombine est l'enzyme-clé de la coagulation (*vide supra*) permettant la transformation du fibrinogène en fibrine insoluble, à la fois amplifiant et limitant sa propre génération. Le travail thrombinique étant généré à plus de 95% après la gélification du plasma, la très grande majorité des tests de coagulation usuels sont pris en défaut et sont donc insuffisants pour obtenir une vision globale du processus de coagulation et du travail thrombinique. Cette méthode non seulement permet une étude globale et presque complète du déroulement de la coagulation, mais est aussi considérée à ce jour comme plus proche des conditions *in vivo* (en revanche le système hémostatique n'est pas exploré dans sa globalité puisque l'hémostase primaire et la fibrinolyse ne sont pas prises en compte). Le principe de la méthode est ancien et sa mise en pratique s'est heurtée à de nombreuses difficultés techniques (conditions non coagulantes par utilisation de plasma défibriné, détection chromogénique empêchant l'utilisation d'échantillons cellulaires...). L'équipe de Hemker a développé depuis plusieurs années une méthode « rénovée » nommée Calibrated Automated Thrombogram® (CAT).

La détection se fait par mesure de la fluorescence générée après clivage, par la thrombine néoformée, d'un substrat spécifique (Z-Gly-Gly-Arg-AMC), choisi pour ces caractéristiques favorables en terme de  $K_m$  et  $K_{cat}$ . La conversion du niveau de fluorescence mesuré en concentration en thrombine est obtenue grâce à l'utilisation d'un calibrant (un complexe thrombine -  $\alpha 2M$ , à l'activité stable et bien déterminée, auquel sont ajoutées de l'héparine et de l'antithrombine pour éviter toute coagulation), permettant ainsi de déduire la part non physiologique de thrombine liée à l' $\alpha 2M$  et également, de corriger les effets de consommation du substrat et de filtre interne ainsi que les facteurs de variabilité liés aux échantillons plasmatiques (couleur), à l'âge de la lampe etc.

Un des avantages majeurs de cette technologie est la possibilité (contrairement à tous les autres tests usuels d'étude de la coagulation), de travailler en présence de populations

cellulaires, comme les plaquettes (mais à l'exception des érythrocytes) grâce à l'utilisation de la fluorescence comme mode de détection. Ceci en fait donc une méthode de choix pour l'étude de l'impact potentiel des PN dans la coagulation.

La courbe de génération obtenue par cette méthode est appelée « thrombinogramme ». De celle-ci, plusieurs informations peuvent être extraites (figure 23) :

- la principale, l'aire sous la courbe permet de quantifier le travail thrombinique total au cours du temps, et est nommée potentiel thrombinique endogène (ou en anglais, ETP, *Endogenous Thrombin Potential*). De nombreuses données indiquent que l'ETP reflète le potentiel coagulant global d'un individu, son augmentation signe une hypercoagulabilité de même qu'une diminution, une hypocoagulabilité [Regnault, 2004 ; Dargaud, 2005 ; van Hylckama Vlieg, 2007 ; Gosh, 2008 ; Trossaert, 2008].
- le temps de latence avant la génération explosive de thrombine, correspondant au changement d'état physique du plasma
- le pic maximal de thrombine générée

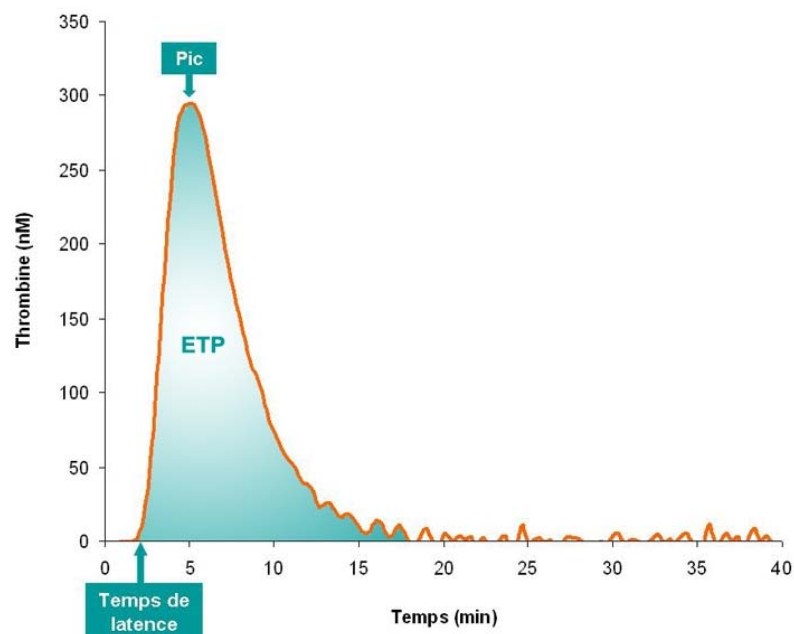


Figure 23 : Courbe de génération de thrombine obtenue en PPP (FT 5 pM et PL<sub>a</sub> 4 μM)

La méthode CAT® est associée à une gamme de réactifs, en fonction de la concentration en facteur tissulaire déclenchant la coagulation, associée ou non à des phospholipides procoagulants bien caractérisés sur le plan qualitatif et quantitatif.

Dans ce travail nous utiliserons principalement :

- PPP LOW® (Diagnostica Stago) : permettant le déclenchement de la coagulation par une faible concentration en facteur tissulaire (1 pM) en présence de phospholipides procoagulants (4 µM), dans du plasma pauvre ou dépourvu en plaquettes. La faible concentration en FT rend la génération de thrombine très sensible à de faibles variations des systèmes amplificateurs (boucle de Josso...) ou inhibiteurs (TFPI, AT).
- MP reagent® (Diagnostica Stago) : apportant uniquement des phospholipides procoagulants (4 µM) et donc permettant la mise en évidence dans l'échantillon d'une activation par l'une ou l'autre voie, intrinsèque ou extrinsèque.
- Innovin® (Dade Behring), dilué dans du tampon HBS : facteur tissulaire recombinant humain relipidé, pour les études en PRP.

## Références

- Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Br J Haematol* 2005;130:653-61.
- Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, Hemker HC, Negrier C. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost*. 2005;93:475 – 80.
- Ghosh K, Mota L, Shetty S, Kulkarni B. Spectrum of changes in endogenous thrombin potential due to heritable disorders of coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2008;19:577 – 80.
- Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:249-53.
- Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:4-15.
- Lecompte T, Wahl D, Regnault V. Thrombinographie. *Hématologie* 2006;12:115-27.
- Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res*. 2004;114:539 – 45.
- Trossaert M, Regnault V, Sigaud M, Boisseau P, Fressinaud E, Lecompte T. Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. *J Thromb Haemost*. 2008;6:486 – 93.
- van Hylckama Vlieg A, Christiansen SC, Luddington R, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Baglin TP. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a

first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. Br J Haematol. 2007;138:769  
– 74.

## **C.II. Influence de PN issus de sujets sains sur la coagulation étudiée par méthodes globales**

### **C.II.1- Préambule**

La littérature fait état de perturbations de l'hémostase et surtout de la coagulation dans des situations pathologiques où les PN sont à l'état activé. Or, très peu de données sont disponibles sur l'impact de ces cellules, à l'état normal.

Cette première partie se propose ainsi d'étudier le retentissement de la présence de PN fonctionnels issus de sujets sains (cf matériels et méthodes) sur les systèmes d'étude de la coagulation définis précédemment.

Les PN fraîchement isolés selon la méthodologie sus décrite sont immédiatement utilisés dans les systèmes ROTEM® et CAT®.

Il faut préciser que les 2 méthodes n'ont pas pu être réalisées simultanément avec un même isolat de PN, pour des raisons techniques (durée des expérimentations, quantité de cellules disponibles...). Les résultats présentés ci-après résultent donc de protocoles expérimentaux chronologiquement indépendants.



## **C.II.2- Influence sur la constitution du caillot étudiée par Thromboélastométrie (ROTEM®)**

### **C.II.2.1 Objectifs**

La technologie ROTEM® permettant d'obtenir une vue globale et dynamique du processus de la formation du caillot, l'objectif de ces essais est d'étudier l'impact des PN sur la constitution du réseau de fibrine *in vitro*. Afin d'être sensible à toute activation ou inhibition de la coagulation, les essais seront réalisés sans déclencher celle-ci ni par du facteur tissulaire, ni par un activateur de la voie contact. De plus, la contamination plaquettaire dans les échantillons n'étant pas nulle (cf matériels et méthodes), les profils TEMogram des suspensions plasmatiques de PN (plasma riche en PN) seront comparées non seulement avec ceux obtenus avec le PDP autologue ayant servi à resuspendre les cellules, mais également avec ceux de PPP autologue ajusté à 5 G/L en plaquettes, correspondant à la contamination plaquettaire moyenne des isolats. L'influence du facteur tissulaire, de la voie contact et de l'activation préalable des PN sont également évaluées. Ces travaux, à l'exception de l'étude de l'influence de l'état d'activation des PN, ont fait l'objet de la publication intégrée ci-après publiés : « *Influence of polymorphonuclear leukocytes on the plasma clot formation as evaluated by thromboelastometry (ROTEM)*. » [Perrin, 2008].

### **C.II.2.2 Matériel et réactifs**

☒ **ROTEM®** (Diagnostics Stago) :

- Appareillage et consommables
- STARTEM® : chlorure de calcium, 0,2 M

☒ **Tubes VACUTAINER** (Becton Dickinson)

☒ **Plasma riche en PN (PN-RP)** ajusté à 10 G/L

☒ **Plasma riche en plaquettes (PRP)** ajusté à 150 G/L

☒ **Plasma dépourvu en plaquettes (PDP)**

☒ **Plasma pauvre en plaquettes (PPP)** ajusté à 5 G/L en plaquettes par dilution du PRP avec le PDP autologue.

☒ **Anticorps anti-Facteur tissulaire HTF-1** (Becton Dickinson).

☒ **Corn trypsin inhibitor (CTI)** (Kordia)

☒ **fMLP** (Sigma) solution mère à  $10^{-5}$  M dans DMSO. Dilution extemporanée dans du Tyrode glucosé.

### **C.II.2.3 Protocoles expérimentaux**

#### **C.II.2.31 Général**

Immédiatement après isolement et ajustement aux concentrations cellulaires désirées, 300 µL d'échantillon (PN-RP, PPR ou PPP) sont disposés dans la cupule plastique et incubés 1 minute à 37°C. La mesure est déclenchée après ajout de 20 µL STARTEM® et pour une durée de 60 minutes (figure 24).

*Nb : Pour chaque série, les échantillons à comparer sont étudiés simultanément.*

#### **C.II.2.32 Influence de la voie du facteur tissulaire**

*J Perrin et al, Thromb Res 2008*

#### **C.II.2.33 Influence de la voie intrinsèque**

*J Perrin et al, Thromb Res 2008*

#### **C.II.2.34 Influence de l'état d'activation des PN**

Les PN stimulés par le fMLP ont été décrits comme exposant le FT à leur surface [Maugeri, 2006]. Nous avons exploré ces données dans nos conditions expérimentales en incubant les PN fraîchement isolés avec du fMLP  $10^{-7}$  M (concentration finale) à 37°C pendant 5 minutes. L'enregistrement a ensuite été déclenché par ajout de 20 µL STARTEM® et pour une durée de 60 minutes. Parallèlement, un enregistrement témoin a été réalisé avec des PN natifs issus du même isolement et incubés à 37°C.

Pour tester l'expression potentielle de FT induite par le fMLP à la surface des PN, nous avons ajouté l'anticorps HTF-1 5 µg/mL juste avant le déclenchement de la mesure.

#### **C.II.2.35 Analyse statistique**

Pour chaque paramètre de mesure ROTEM® choisi, les résultats seront exprimés en moyenne ± écart-type et les différents groupes (PN-RP, PRP, PPP ; PN-RP ± HTF-1 ; PN-RP ± CTI et PN-RP ± fMLP) seront comparés deux à deux par le test de Wilcoxon à l'aide du logiciel STATVIEW® version 5.0.0.0.

Une valeur de *p* inférieure à 0,05 sera considérée comme statistiquement significative.

## ROTEM®

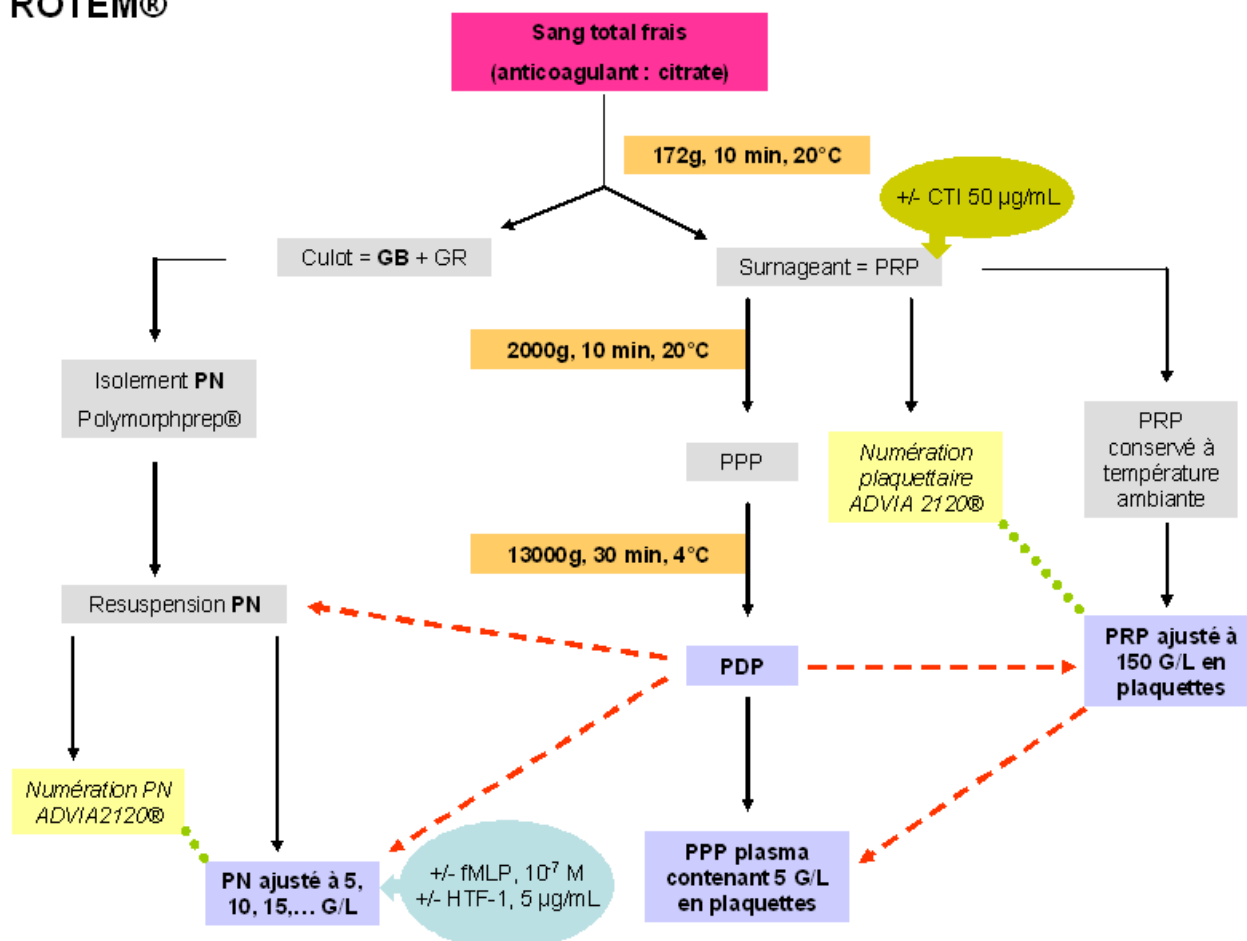


Figure 24 : Récapitulatif protocoles expérimentaux (ROTEM®)

### C.II.2.4 Résultats

Les résultats, à l'exception de l'étude de l'influence de la stimulation des PN par le fMLP, et la discussion correspondante sont présentés dans la publication suivante « *Influence of polymorphonuclear leukocytes on the plasma clot formation as evaluated by thromboelastometry (ROTEM).* » Perrin J, Morlon L, Vigneron C, Marchand-Arvier M. Thromb Res. 2008;121(5):647-52.

*NB : la comparaison des résultats concernant le CFT n'a pu être réalisée, car une amplitude de 20 mm sur le tracé (nécessaire au calcul de ce paramètre) n'est souvent pas atteinte avec les échantillons de PPP ou PN-RP.*

**C.II.2.41 Comparaison profils et paramètres PN-RP vs PRP vs PPP (N=13)**  
*J Perrin et al, Thromb Res 2008*

**C.II.2.42 Influence de la voie du facteur tissulaire : PN-RP vs PN-RP + HTF-1 5 µg/mL (N=7)**  
*J Perrin et al, Thromb Res 2008*

**C.II.2.43 Influence de la voie intrinsèque : PN-RP vs PN-RP + CTI 50 µg/mL (N=5)**  
*J Perrin et al, Thromb Res 2008*

Author's personal copy

Thrombosis Research (2008) 121, 647–652



THROMBOSIS  
RESEARCH

intl.elsevierhealth.com/journals/thre

REGULAR ARTICLE

## Influence of polymorphonuclear leukocytes on the plasma clot formation as evaluated by thromboelastometry (ROTEM®)

Julien Perrin\*, Lise Morlon, Claude Vigneron, Monique Marchand-Arvier

Department of Hematology and Physiology, EA 3452 Faculty of Pharmacy, Nancy-University, France

Received 19 June 2006; received in revised form 1 June 2007; accepted 13 June 2007  
Available online 10 August 2007

### KEYWORDS

Polymorphonuclear  
leukocytes;  
Rotative  
thromboelastometry;  
Clot;  
Coagulation;  
Velocity curve

### Abstract

**Objective:** It has been emphasized that polymorphonuclear leukocytes (PMN) participate in the regulation of coagulation. However, the mechanisms of action are not clear. Besides a procoagulant activity, anticoagulant or fibrinolytic properties are attributed to these cells. To explore their global effect, we have studied their involvement in the clot formation with thromboelastometry, which gives global view over the clotting process, in particular on the structure of the clot and on the kinetic of its formation.

**Methods:** PMN were isolated from healthy blood donors and resuspended into autologous platelet-free plasma. The ROTEM® device was used. Coagulation was triggered only by adding calcium chloride. Thromboelastometric profiles of PMN-rich plasma (PMN-RP) were compared with autologous platelet-rich (PRP) and platelet-poor plasma (PPP). The inhibition of both tissue factor and intrinsic pathways was also studied.

**Results and conclusions:** The procoagulant activity of resting PMN was demonstrated as the initiation of fibrin formation with PMN-RP was significantly faster compared with both PRP and PPP. The kinetic of plasma clotting was remarkably improved with PMN-RP compared with PPP. However, the clot with PMN-RP had the same poor viscoelastical properties as PPP. Thromboelastometry gives a new point of view in the involvement of PMN in coagulation, in the absence of any PMN pre-activation. Their impact was centred on the kinetic and the facilitation of the clot formation.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Faculté de Pharmacie, Laboratoire d'Hématologie-physiologie, 5, rue Albert Lebrun, 54001 Nancy Cedex, France. Tel.: +33 3 83 68 23 18; fax: +33 3 83 68 23 19.

E-mail addresses: [julien\\_perrin\\_3@hotmail.com](mailto:julien_perrin_3@hotmail.com) (J. Perrin), [lise.morlon@club-internet.fr](mailto:lise.morlon@club-internet.fr) (L. Morlon), [c.vigneron@chu-nancy.fr](mailto:c.vigneron@chu-nancy.fr) (C. Vigneron), [mmarvier@hotmail.fr](mailto:mmarvier@hotmail.fr) (M. Marchand-Arvier).



## Introduction

Although the procoagulant activity of polymorphonuclear leukocytes (PMN) is not a new concept [1], the involvement of these cells in coagulation requires further attention. Especially as they might support two opposite properties, pro- and anticoagulant (even fibrinolytic properties) [2,3]. *In vivo*, thrombin generation is initiated by tissue factor (TF) bearing cells [4], but, unlike monocytes, constitutive expression and/or production of TF by PMN remains disputed [5,6]. Furthermore, granulocytic enzymes like elastase and cathepsin G are able to activate factor V and platelets, respectively [7,8]. Moreover, a link between ischemic cardiovascular events and high leukocytes count has been established [9]. In the same way, the thrombotic risk in polycythemia vera or essential thrombocythemia has been associated with increased leukocytes counts, as well as changes in PMN functionality, resulting in an activation of these cells [10]. In addition, activation of PMN has been proposed as one of the factors contributing to biomaterials-associated thrombosis [11]. In conclusion, several indications support a procoagulant effect of PMN cells. In contrast, several coagulation factors are known to be inactivated by neutrophils-derived products, such as reactive oxygen-derived species [12]. However, the potential implication of PMN has predominantly been studied in pathological or non-physiological conditions, where their functionality is altered. Thrombi have been demonstrated to contain an abundance of PMN [13]. In addition, the chemotactic activity of thrombin on these cells [14] suggests an active recruitment during the clot formation. Thromboelastometry is a method developed to record viscoelastical changes during coagulation, providing a graphical representation of the fibrin polymerization process [15]. Since this methodology, including dynamic parameters reflecting the dynamic changes during the fibrin polymerization process, gives an overall assessment of clot formation, it appears attractive to use it for functional analysis of the potential implication of PMN in regulation of haemostasis. The aim of this study was to determine if PMN cells enhance or interfere with fibrin formation. Thus, we studied the thromboelastometric profiles of PMN-rich plasma (PMN-RP), compared with platelet-rich (PRP) and platelet-poor plasma (PPP).

## Materials and methods

### Materials and reagents

Materials and reagents used were Fluoroskan Ascent (Thermo, Saint Herblain, France); Polymorphprep® (Axis-Shield poC AS, Oslo, Norway); Opsonized-zymosan, phorbol myristate acetate (PMA), and luminol (Sigma-Aldrich, Lyon, France); corn trypsin inhibitor

(Leiden, Kordia, the Netherlands) and HTF-1 (Becton-Dickinson, Le Pont-De-Claix, France).

ROTEM® and all devoted reagents (Star-TEM®) were provided by Biodis (Signes, France).

### Blood collection and samples preparation

Polymorphonuclear leukocytes were isolated from healthy donors ( $N=25$ ), after informed consent. Whole blood (15 mL) was anticoagulated with trisodium citrate (0.129 M; 1 volume for 9 volumes whole blood; Becton Dickinson, France) and centrifuged ( $172\times g$ , 10 min,  $20^\circ\text{C}$ ). The supernatant (platelet-rich plasma) was removed and stored at room temperature. Sedimented cells were used to isolate PMN.

### PRP, PFP and PPP preparation

Platelet-rich plasma was aliquoted in two fractions. The first fraction was centrifuged at  $2000\times g$  for 10 min at  $20^\circ\text{C}$ . The supernatant was removed and centrifuged at  $13,000\times g$  for 30 min at  $4^\circ\text{C}$  in order to remove as many cellular microvesicles as possible and to obtain platelet-free plasma (PFP). The second fraction of PRP was counted with ADVIA 2120® (BAYER, Germany) and adjusted to  $150\times 10^9$  platelets/L with autologous PFP. To evaluate the contribution of few platelets in the clot formation, platelet-poor plasma (PPP), containing  $5\times 10^9$  platelets/L, was also prepared diluting PRP with autologous PFP.

### PMN-rich plasma

Cells were isolated using a method based on a density gradient adapted from manufacturer's instructions. In brief, sedimented cells were diluted to the original blood volume with Tyrode's buffer (pH 7.4) and layered on the Polymorphprep® medium. After centrifugation ( $475\times g$ , 33 min,  $18^\circ\text{C}$ ), leukocytes appear in two separated bands. The lower band containing PMN was resuspended with Tyrode's buffer. The cell suspension then was centrifuged ( $400\times g$ , 10 min,  $20^\circ\text{C}$ ). Residual erythrocytes were lysed with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.87%. PMN cells were finally washed with Tyrode's buffer and resuspended in autologous PFP. The cell count was determined with ADVIA 2120® and PMN-RP was adjusted to  $10\times 10^9$  PMN/L with autologous PFP.

At the same time, a fraction of PMN is resuspended into Tyrode's buffer and adjusted to  $5\times 10^9$  /L in order to test their functionality by chemiluminescence. Briefly, 35  $\mu\text{L}$  cell suspension was incubated with 70  $\mu\text{L}$  opsonized-zymosan (15 mg/mL) or PMA (10  $\mu\text{g}$ /L) at  $37^\circ\text{C}$  and after addition of 245  $\mu\text{L}$  luminol ( $10^{-4}$  M), the generation of reactive oxygen-derived species was recorded by chemiluminescence. Spontaneous chemiluminescence, in the absence of any PMN agonist, was also recorded.

### Rotative thromboelastometry

The ROTEM® device is an instrument based on the thromboelastometry principle, with the advantages that up to 4 samples can be tested simultaneously. Data are continuous, digital and retrievable for calculation of new dynamic parameters, describing rate-specific characteristics of the clot formation. In short, samples and reagents were dispensed into a plastic cup, within a cup holder thermostatically controlled at  $37^\circ\text{C}$ . A plastic pin is fixed to an oscillating axis ( $4^\circ/75$ ). Then, the pin is put into the mixture. During coagulation, resistance against movements of the pin is recorded by a photo sensor and converted to a real-time graph, called TEMogram. All experiments were performed according to manufacturer's instructions. We used a global test (NATEM®), only with  $\text{CaCl}_2$  to trigger the reaction and without addition of a coagulation activator. NATEM® is very sensitive to almost any kind of coagulation activation or



inhibition in samples and is expected to provide an overview of the spontaneous coagulation process.

#### Comparison of PMN-RP TEMograms with PRP and PPP (N=13)

A volume of 300  $\mu$ L sample mixture (PMN-RP, PRP or PPP freshly prepared) was put into the plastic cup and recordings were started after the addition of 20  $\mu$ L Star-TEM® (CaCl<sub>2</sub>, 0.2 M). For each donor (N=13), the three experiments (PMN-RP, PRP or PPP) were conducted simultaneously, with a total measurement time of 60 minutes. On the resulting TEMograms, the following parameters were used for further analysis: Clotting time (CT; s), Maximum Clot Firmness (MCF; mm), Time to reach MCF (MCF-t; s), and alpha angle (°).

Recently, new parameters have been proposed by analysing the first derivative curve of the TEMogram [16]. They give new data on the kinetic of the clot formation: Maximum velocity (MAXV; maximum of the first derivative curve of the clot formation; it is reported in mm/min) and time to achieve maximum of first derivative (MAXV-t: time from reaction start to reach the maximum velocity; it is reported in seconds).

All these parameters will be analysed according to the fibrin formation phase they describe; the parameters are combined to describe different phases of the clotting process, hence initiation (CT, MAXV-t), kinetic of the clot formation (alpha, MAXV, MCF-t) and termination/final clot strength (MCF).

Mean and standard deviation were calculated for each parameter and statistical comparison between groups was performed by Kruskal–Wallis test. Intra-groups differences were studied using the Wilcoxon signed-rank test.

#### Inhibition of tissue factor pathway (N=7)

To test the implication of the TF pathway in the coagulation process of PMN-RP, we used HTF-1, a specific monoclonal antibody against human TF. HTF-1 (5  $\mu$ g/mL final concentration) was added to PMN-RP (N=7) immediately before the addition of 20  $\mu$ L Star-TEM® (CaCl<sub>2</sub>, 0.2 M) and profiles were compared with PMN-RP (without HTF-1). The effect of HTF-1 on the TEMograms parameters was analysed using the Wilcoxon signed-rank tests.

#### Inhibition of intrinsic pathway (N=5)

In order to prevent the initiation of coagulation *via* the intrinsic pathway, corn trypsin inhibitor (CTI, 50  $\mu$ g/mL final concentration) was added to plasma immediately after the centrifugation of whole blood (172 $\times$ g, 10 min, 20 °C). Then PMN-RP (N=5) was prepared as described above. In parallel, PMN-RP without CTI

was produced. The effect of CTI on TEMograms parameters was analysed using the Wilcoxon signed-rank tests.

## Results

### Isolation procedure

PMN purity was >97 %; monocytes were less than 1%. Residual platelets in PMN-RP, after adjustment to  $10 \times 10^9$  PMN/L, were  $5 \pm 4 \times 10^9$ /L. The isolation procedure did not alter the PMN functionality (as normal chemiluminescence was detected after stimulation by opsonized-zymosan and PMA) nor activated them (as no spontaneous chemiluminescence was detected in the absence of any PMN stimulation, immediately after isolation) (data not shown).

### TEMograms

#### Comparison of PMN-RP TEMograms with PRP and PPP

As shown by Fig. 1, the difference between the thromboelastometric profiles of PMN-RP, PRP and PPP was obvious, and the differences were statistically significant ( $p < 0.05$ ). Detailed analyses between groups are presented in Table 1.

#### Initiation of the clot formation: CT and MAXV-t

The initiation of the clot formation appeared to be significantly faster with PMN-RP compared with PPP alone. But it is especially important to note that it was also faster compared with PRP. The clotting time (CT) and MAXV-t were significantly shorter with PMN-RP (platelet-poor plasma had the significantly most prolonged clotting time).

#### Velocity/kinetic of the clot formation: alpha angle, MCF-t and MAXV

The velocity of the clot formation in the presence of PMN was significantly enhanced compared with PPP alone. Hence, with PMN-RP, the alpha angle and MAXV were higher and the MCF-t was shorter than with PPP. However, the velocity of the clot formation in presence of PMN was significantly lower than PRP, as shown by the reduced alpha angle and MAXV values. Concerning the MCF-t value, there was no statistically significant difference between PMN-RP and PRP. In conclusion, the velocity of clot

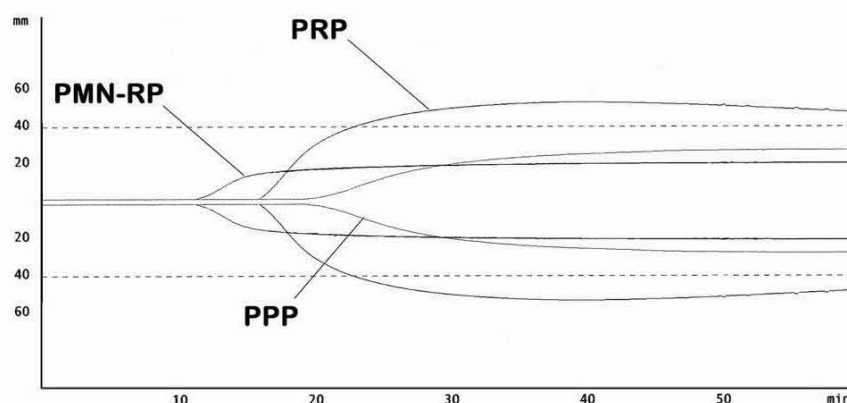


Figure 1 Typical thromboelastometric profiles of PMN-RP, PRP and PPP after calcium chloride addition (NATEM®).

**Table 1** Analysis of parameters from 13 different experiments

|                           |               | PMN-RP<br>10×10 <sup>9</sup> /L | PRP<br>150×10 <sup>9</sup> /L | PPP<br>5×10 <sup>9</sup> /L | <i>p</i> values   |                   |                |
|---------------------------|---------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|----------------|
|                           |               |                                 |                               |                             | PMN-RP vs.<br>PRP | PMN-RP vs.<br>PPP | PRP vs.<br>PPP |
| Initial TEMogram<br>graph | CT (s)        | 800±134                         | 920±110                       | 1234±149                    | 0.0392            | 0.0015            | 0.0015         |
|                           | MCF (mm)      | 22±4                            | 55±3                          | 28±4                        | 0.0014            | 0.0014            | 0.0014         |
|                           | MCF-t (s)     | 1704±309                        | 1577±135                      | 1985±205                    | <b>0.2213</b>     | 0.0277            | 0.0015         |
|                           | Alpha (°)     | 43±9                            | 55±4                          | 29±4                        | 0.0021            | 0.003             | 0.0015         |
| First derivative<br>curve | MAXV (mm/min) | 5.1±1.6                         | 7.5±1.0                       | 3.3±0.7                     | 0.0021            | 0.0062            | 0.0019         |
|                           | MAXV-t (s)    | 918±157                         | 1079±139                      | 1400±128                    | 0.0231            | 0.0022            | 0.0022         |

Results are presented as mean±SD (non-significant values are set in bold characters).

formation in PMN-RP appeared intermediary between PRP and PPP.

### Clot termination: MCF

The firmness of the fibrin clot of PMN-RP was significantly lower than with PRP or PPP. Hence, the viscoelasticity and the strength of the clot are poor in the presence of PMN.

### Inhibition of tissue factor pathway

Results following inhibition of TF-pathway by HTF-1 are presented in Table 2 and illustrated by Fig. 2. HTF-1 had no significant effect on the initiation or kinetic of the clot formation; neither the CT nor the MAXV-t changed in presence of the antibody. Only the clot's strength seemed to be slightly decreased in the presence of HTF-1.

### Inhibition of intrinsic pathway

Results following inhibition of the intrinsic pathway by CTI are presented in Table 3 and illustrated by Fig. 3. In the presence of CTI (50 µg/mL) PMN-RP had a significantly longer clotting time and lower MAXV-t, indicating that the spontaneous initiation of clot formation depends primarily on the intrinsic pathway. In contrast, none of the kinetic parameters (alpha angle, MAXV and MCF-t) was modified by CTI.

## Discussion

Adopting a thromboelastometric model, the influence of resting polymorphonuclear leukocytes on clot initiation, clot kinetics and maximum clot firmness has been studied. We showed that plasma containing PMN had a significantly different profile from PPP, in particular influencing the initiation of the clotting. Since the platelet counts were almost identical in PPP

and PMN-RP, the observed differences are attributable to the presence of PMN. In particular, the clotting time in the presence of PMN was consistently shorter than with PRP, indicating an independent procoagulant effect of PMN. Hence, our data suggest that PMN enhance the initiation of coagulation, thus enhance the early thrombin generation. Physiological thrombin generation is initiated by tissue factor interaction with FVIIa [4]. Tissue factor expression by PMN is still discussed extensively, but a recent study reported that these cells are able to produce and express functional TF after stimulation e.g. by fMLP and P-selectin [17]. In order to test the involvement of the TF pathway on the initiation of coagulation with PMN, a specific blocking antibody against human TF was used. No changes of the clotting time were detected, suggesting that the impact of PMN on the initiation phase of clotting was not due to TF activity. In contrast, the mean CT and MAXV-t were almost twofold prolonged in the presence of CTI. A plausible explanation for the remaining clot formation may be caused by the delay before CTI was added to plasma, probably resulting in activation of a few FXII molecules. These results show that, in our conditions, contact pathway is largely implicated in the initiation of fibrin formation. Since CTI interfered with the procoagulant effect of the PMN, it may be hypothesized that the procoagulant stimulus provided by these cells is located downstream from the FXII activation, for example by acting on the intrinsic tenase. However, PMN do not seem to support the

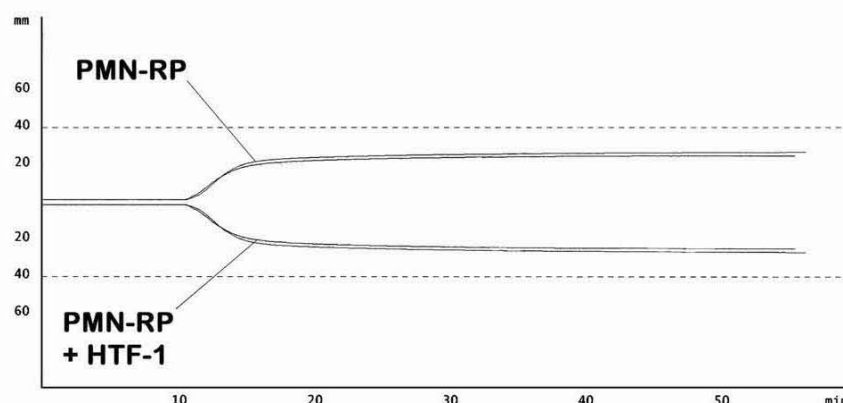
**Table 2** Influence of HTF-1 on parameters with PMN-RP (N=7)

|                        |               | PMN-RP 10×10 <sup>9</sup> /L | PMN-RP 10×10 <sup>9</sup> /L + HTF-1 5 µg/mL | <i>p</i> values |
|------------------------|---------------|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------|
| Initial TEMogram graph | CT (s)        | 743±92                       | 769±104                                      | <b>0.1755</b>   |
|                        | MCF (mm)      | 23±4                         | 22±4                                         | 0.0152          |
|                        | MCF-t (s)     | 1965±486                     | 1850±536                                     | <b>0.1763</b>   |
|                        | Alpha (°)     | 47±10                        | 46±5                                         | <b>0.6741</b>   |
| First derivative curve | MAXV (mm/min) | 5.4±1.6                      | 4.9±0.9                                      | <b>0.2568</b>   |
|                        | MAXV-t (s)    | 828±123                      | 845±103                                      | <b>0.8658</b>   |

Results are presented as mean±SD (non-significant values are set in bold characters).



Author's personal copy



**Figure 2** Influence of tissue factor pathway inhibition by HTF-1 (5 µg/mL) on the clot formation with PMN-RP.

assembly of this complex [18]. Nevertheless, our results showed that the PMN participated in the amplification of the clot development. PMN enhanced the velocity of fibrin polymerization in comparison with PRP, although it was not as efficient as found with PRP. PMN may potentiate the amplification *via* several mechanisms: (1) the assembly of the prothrombinase complex is possible on their surface [19], although it has probably not a major contribution because the kinetics of clot formation is less efficient than the phospholipid surfaces provided by PRP; (2) it may be speculated if the alternative movement of the pin, producing a slight agitation, might progressively activate or prime PMN, leading to their degranulation and release of several products such as elastase and cathepsin G, which are known to interact with coagulation factors [7,8]. Supposing that the PMN released their granules content products in our experimental conditions, our data indicate that the overall global effect is a procoagulant stimulus.

The maximum clot firmness registered in PMN-RP was significantly lower compared with both PRP and PPP. This difference indicates that the clot in presence of PMN has poor viscoelastical properties. The MCF mainly depends on the platelets concentration and level of fibrinogen. Since the GPIIb/IIIa receptor is not present on PMN surface, it was

expectable to obtain a more fragile clot with PMN-RP. Moreover, the MCF also depends on the covalent stabilization of fibrin by factor XIIIa. Contradictory data are related to the influence of PMN on factor XIII. Action of granulocytic proteases on factor XIII can come either to an activation or to a degradation [20,21]. A previous study has established a negative correlation between plasma levels of elastase and factor XIII in patients with septic shock [22]. Hence, a decrease in factor XIIIa activity due to PMN may contribute to explain the poor clot firmness and this also adds to the hypothesis that PMN are activated during the coagulation process. Interestingly, PMN-RP and PPP had significantly different MCF, whereas both contained the same number of platelets. Our data suggest that the presence of PMN in plasma may interfere with the termination of fibrin polymerization, as well as with the overall clot stability.

In conclusion, our results indicate that PMN independently take part in initiation, propagation and termination of the *in vitro* clot formation. It is important to emphasize that the present experiments were performed using non-stimulated cells populations. Pre-activated or activated leukocytes are appreciated to participate in the coagulation process [7,11,16]. In the same manner, PMN

**Table 3** Influence of CTI on parameters with PMN-RP (N=5)

|                        |               | PMN-RP<br>10×10 <sup>9</sup> /L | PMN-RP 10×10 <sup>9</sup> /L +<br>CTI 50 µg/mL | p values      |
|------------------------|---------------|---------------------------------|------------------------------------------------|---------------|
| Initial TEMogram graph | CT (s)        | 660 ± 138                       | 1226 ± 305                                     | 0.0431        |
|                        | MCF (mm)      | 20 ± 3                          | 17 ± 1                                         | 0.0412        |
|                        | MCF-t (s)     | 1689 ± 192                      | 1488 ± 267                                     | <b>0.0796</b> |
|                        | Alpha (°)     | 41 ± 7                          | 35 ± 3                                         | <b>0.0796</b> |
| First derivative curve | MAXV (mm/min) | 4.3 ± 1.0                       | 3.5 ± 0.6                                      | <b>0.1025</b> |
|                        | MAXV-t (s)    | 764 ± 155                       | 1324 ± 333                                     | 0.0431        |

Results are presented as mean ± SD (non-significant values are set in bold characters).

Author's personal copy

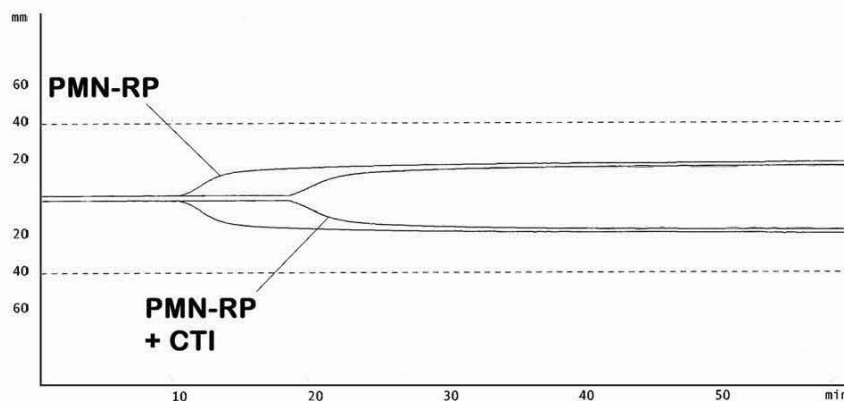


Figure 3 Influence of intrinsic pathway inhibition by CTI (50 µg/mL) on the clot formation with PMN-RP.

procoagulant properties are frequently related to their interaction with endothelial cells [23], and the damages caused by granulocytes-derived products promote coagulation initiation [24]. In conclusion, our study shows that PMN have an own *in vitro* procoagulant activity which does not require a pre-activation, nor interactions with endothelium.

## References

- [1] Saba HI, Herion JC, Walker RI, Roberts HR. The procoagulant activity of granulocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973;142: 614–20.
- [2] Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG, et al. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Med Biol* 2003;15: 1075–89.
- [3] Moir E, Booth NA, Bennett B, Robbie LA. Polymorphonuclear leucocytes mediate endogenous thrombus lysis via a u-PA-dependent mechanism. *Br J Haematol* 2001;113:72–80.
- [4] Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev* 2003;17:S1–5.
- [5] Nakamura S, Imamura T, Okamoto K. Tissue factor in neutrophils: yes. *J Thromb Haemost* 2004;2:214–7.
- [6] Osterud B. Tissue factor in neutrophils: no. *J Thromb Haemost* 2004;2:218–20.
- [7] Gillis S, Furie BC, Furie B. Interactions of neutrophils and coagulation proteins. *Semin Hematol* 1997;34:336–42.
- [8] Samis JA, Garrett M, Manuel RP, Nesheim ME, Giles AR. Human neutrophil elastase activates human factor V but inactivates thrombin-activated human factor V. *Blood* 1997;90:1065–74.
- [9] Collier BS. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality. Is it time to intervene? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:658–70.
- [10] Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, et al. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2000;96:4261–6.
- [11] Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* 2004;25:5681–703.
- [12] Stief TW, Kurz J, Doss MO, Fareed J. Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelets aggregation of human blood. *Thromb Res* 2000;97: 473–80.
- [13] Wakefield TM, Strieter RM, Prince MR, Downing LJ, Greenfield LJ. Pathogenesis of venous thrombosis: a new insight. *Cardiovasc Surg* 1997;1:6–15.
- [14] Morin A, Marchand-Arvier M, Dautremerpeuch F, Vigneron C. Localization of the structural domain responsible for the chemotactic properties of thrombin on polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Res* 1990;60:33–42.
- [15] Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clin Lab Haematol* 2005;27:81–90.
- [16] Sørensen B, Johansen P, Christiansen K, Woelke M, Ingerslev J. Whole blood coagulation thromboelastographic profiles employing minimal tissue factor activation. *J Thromb Haemost* 2003;1:551–8.
- [17] Maugeri N, Brambilla M, Camera M, Carbone A, Tremoli E, Donati MB, et al. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost* 2006;4:1323–30.
- [18] Bouchard BA, Tracy PB. Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr Opin Hematol* 2001;8:263–9.
- [19] Bouchard BA, Tracy PB. The participation of leukocytes in coagulant reactions. *J Thromb Haemost* 2003;1:464–9.
- [20] Klingemann HG, Egbring R, Holst F, Gramse M, Havemann K. Degradation of human plasma fibrin stabilizing factor XIII subunits by human granulocytic proteinases. *Thromb Res* 1982;28: 793–801.
- [21] Henriksson P, Nilsson IM, Ohlsson K, Stenberg P. Granulocyte elastase activation and degradation of factor XIII. *Thromb Res* 1980;18:343–51.
- [22] Tanaka H, Sugimoto H, Yoshioka T, Sugimoto T. Role of granulocyte elastase in tissue injury in patients with septic shock complicated by multiple-organ failure. *Ann Surg* 1991;213: 81–5.
- [23] Watanabe T, Tokuyama S, Yasuda M, Sasaki T, Yamamoto T. Changes of tissue factor-dependent coagulant activity mediated by adhesion between polymorphonuclear leukocytes and endothelial cells. *Jpn J Pharmacol* 2001;86: 399–404.
- [24] Jacobi J, Sela S, Cohen HI, Chezar J, Kristal B. Priming of polymorphonuclear leukocytes: a culprit in the initiation of endothelial cell injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2051–8.

**C.II.2.44 Influence de la stimulation des PN par le fMLP : PN-RP vs PN-RP + fMLP 10<sup>-7</sup> M (N=7)**

L'activation des PN fraîchement isolés par incubation avec le fMLP 10<sup>-7</sup> M (concentration finale) aboutit à une réduction statistiquement significative du temps de coagulation (CT et indirectement MAXV-t) par rapport aux PN seuls (tableau 8 et figure 25). En revanche, aucune modification des autres paramètres n'est notée. La stimulation des PN semble donc influencer uniquement sur l'initiation de la coagulation.

**Tableau 8 : Influence de la stimulation des PN par le fMLP sur les paramètres ROTEM® (N=7 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type)**

|                               |                  | PN-RP<br>10x10 <sup>9</sup> /L | PN-RP<br>10x10 <sup>9</sup> /L<br>+ fMLP 10 <sup>-7</sup> M | p       |
|-------------------------------|------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------|
| Profil<br>TEMogram<br>brut    | CT<br>(s)        | 770<br>± 137                   | 725<br>± 123                                                | 0,0178  |
|                               | MCF<br>(mm)      | 25<br>± 5                      | 25<br>± 4                                                   | >0,9999 |
|                               | MCF-t<br>(s)     | 1855<br>± 235                  | 1917<br>± 392                                               | 0,3980  |
|                               | Alpha<br>(°)     | 49<br>± 10                     | 50<br>± 8                                                   | 0,2025  |
| Courbe<br>dérivée<br>première | MAXV<br>(mm/min) | 6,1<br>± 2,2                   | 6,1<br>± 2,0                                                | 0,4142  |
|                               | MAXV-t<br>(s)    | 878<br>± 179                   | 818<br>± 133                                                | 0,0425  |



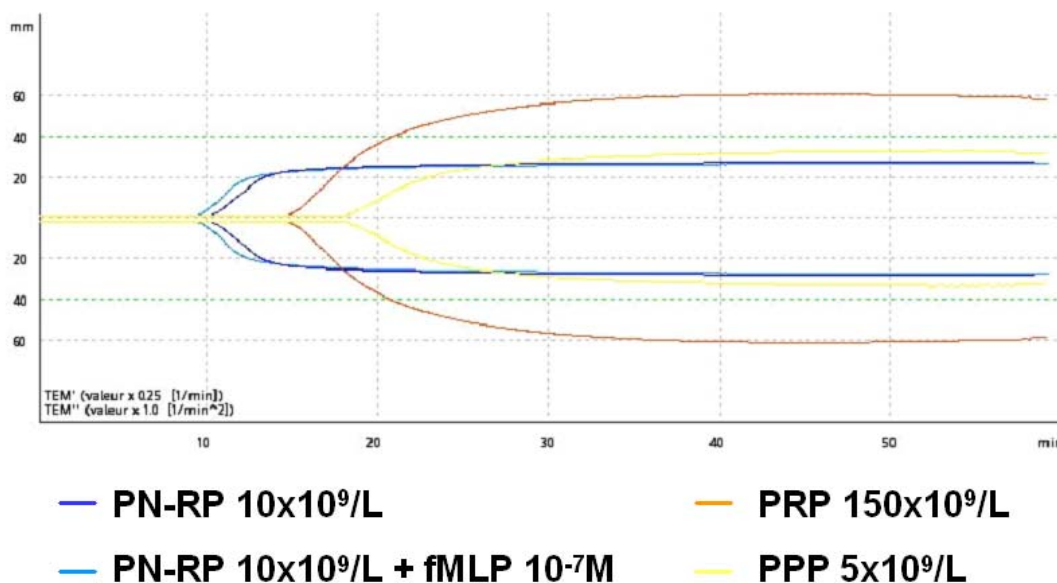


Figure 25 : TEMogram-type de PN-RP stimulés ou non par du fMLP

*Influence de la stimulation des PN par le fMLP : implication du facteur tissulaire (N=3)*

Malgré notre faible échantillon, il apparaît que la réduction du temps de coagulation après stimulation des PN par le fMLP ne soit pas due à une expression de FT (tableau 9 et figure 26). En effet, l'ajout de l'anticorps bloqueur HTF-1 après l'incubation avec le fMLP n'a pas modifié le CT ni les autres paramètres ROTEM®.

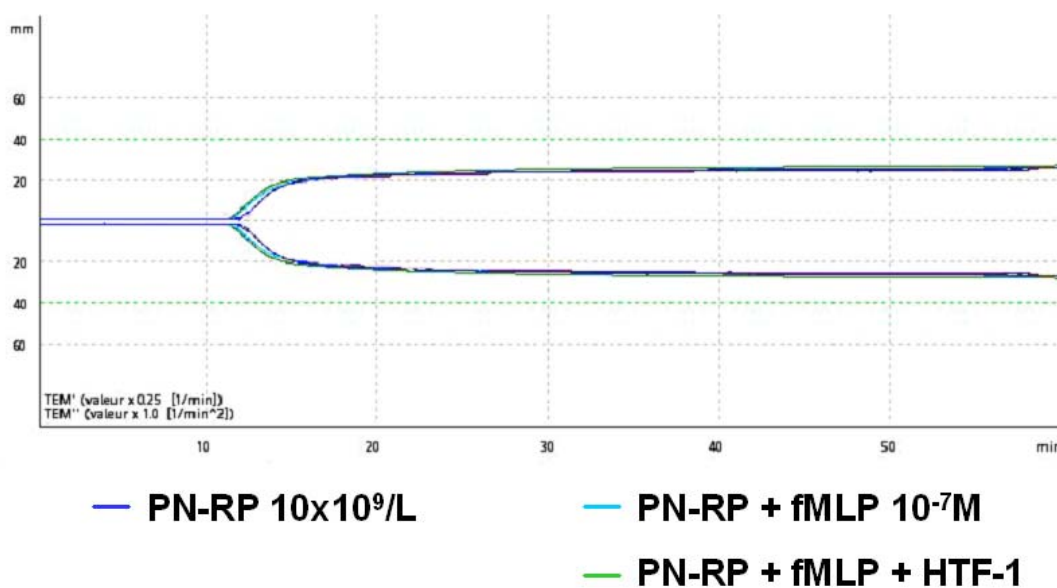


Figure 26 : Inhibition de la voie du facteur tissulaire par HTF-1 après stimulation des PN par le fMLP

**Tableau 9 : Implication de la voie du facteur tissulaire par HTF-1 dans l'effet observé après stimulation des PN par le fMLP (N=3 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type)**

|                               |                  | PN-RP<br>10x10 <sup>9</sup> /L<br>+ fMLP 10 <sup>-7</sup> M | PN-RP<br>10x10 <sup>9</sup> /L<br>+ fMLP 10 <sup>-7</sup> M<br>+ HTF-1 | P      |
|-------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------|
| Profil<br>TEMogram<br>brut    | CT<br>(s)        | 751<br>± 119                                                | 729<br>± 73                                                            | 0,1797 |
|                               | MCF<br>(mm)      | 23<br>± 4                                                   | 24<br>± 4                                                              | 0,0833 |
|                               | MCF-t<br>(s)     | 2166<br>± 523                                               | 1903<br>± 273                                                          | 0,2850 |
|                               | Alpha<br>(°)     | 49<br>± 8                                                   | 48<br>± 10                                                             | 0,4142 |
| Courbe<br>dérivée<br>première | MAXV<br>(mm/min) | 5,7<br>± 2,1                                                | 5,7<br>± 2,1                                                           | ND     |
|                               | MAXV-t<br>(s)    | 819<br>± 97                                                 | 811<br>± 96                                                            | 0,2850 |

### C.II.2.5 Discussion complémentaire

Les expérimentations discutées dans la publication *J Perrin et al, Thromb Res 2008* ont montré que les PN au repos supportent bel et bien une action sur la coagulation, étudiée sous l'angle de la constitution du caillot. Cet effet est directement attribuable aux PN eux-mêmes, et non à la contamination plaquettaire résiduelle des isolats. De plus, cette activité n'est pas due dans nos conditions à une activité facteur tissulaire, ce qui exclue également une intervention de monocytes résiduels dans la suspension riche en PN, dont la participation est largement due à l'expression de FT. Il est possible que cet effet sur le temps de coagulation soit attribuable à l'action du contenu des granulations et donc que les PN ont été stimulés. D'autant que le FXIIa est connu comme activateur des PN [Wachtfogel, 1986], induisant la dégranulation jusqu'au stade final des grains azurophiles, et donc d'HNE notamment. L'activation de la voie contact est probablement impliquée dans l'activation des PN car les premières minutes, mais puisque la présence de CTI n'abolit pas complètement ce profil, il est fort probable que d'autres mécanismes d'activation soient en jeu.

Nous avons poursuivi les expérimentations en évaluant l'effet sur la cinétique de constitution du caillot d'une stimulation préalable des PN. Nous avons choisi comme agoniste le fMLP car d'une part celui-ci induit une mobilisation/activation spécifique PN (et sans activité sur les plaquettes) et d'autre part car l'équipe de Maugeri a montré qu'il est capable d'induire la production et l'expression de FT fonctionnel à la surface des PN [Maugeri, 2006]. La préincubation des cellules avec le fMLP a induit une réduction de CT significativement plus importante que celle déjà obtenue avec les PN natifs, sans modification des autres paramètres, notamment de fermeté du caillot. Cela confirme que l'activation des PN entre en jeu dans leur rôle/implication dans la coagulation. Aussi, cela appuie plus encore le fait que la réduction du temps de coagulation, observée dans toutes les expérimentations, soit due à un effet spécifique et fonctionnel des PN, et non à la contamination plaquettaire.

En revanche, nos résultats ne confirment pas les données de Maugeri, car l'ajout d'HTF-1 après incubation avec le fMLP n'a pas modifié le temps de coagulation, indiquant que la voie du FT n'entre pas en jeu dans la favorisation de l'initiation du processus, à la réserve près que notre nombre d'essais est limité (N=3). Même si nos conditions de stimulation sont légèrement différentes de celles de l'équipe italienne (nous avons utilisé une concentration moindre de fMLP mais une incubation plus longue), il apparaît peu probable qu'elles soient à l'origine des discordances entre les résultats.

Dans ces conditions, il apparaît plus vraisemblable que l'effet observé après stimulation par le fMLP soit dû à la libération par exocytose du contenu granulaire des enzymes granulocytaires dans le plasma, comme la Cath G ou l'HNE.



## MEMO

*Dans un système d'étude global de la cinétique de formation du caillot, les PN au repos de sujets sains font état d'une activité procoagulante non négligeable, par rapport à un milieu riche ou pauvre en plaquettes, se traduisant par une accélération de la formation des premiers filaments de fibrine. Toutefois, et de façon attendue, le caillot en présence de PN a des propriétés viscoélastiques moindres qu'un caillot plaquettaire. Cette activité procoagulante est encore améliorée lorsque les PN sont préalablement activés par le fMLP.*

*L'activité procoagulante granulocytaire observée dans nos conditions n'est pas due à une expression constitutive ou induite de FT, et l'hypothèse la plus probable est une action du contenu granulaire, libéré après exocytose, après activation des PN notamment par le FXIIa.*



### **C.II.3- Influence sur la génération de thrombine étudiée par Thrombinographie (CAT®)**

#### **C.II.3.1 Objectifs**

Après avoir montré dans la partie C.II.1 que les PN de sujets sains favorisent la coagulation sous l'angle de la constitution du réseau de fibrine, cette deuxième série expérimentale a pour but d'étudier l'influence de PN fraîchement isolés de sujets sains sur la génération d'activité thrombinique. Dans les conditions retenues, la coagulation est déclenchée par une faible concentration en facteur tissulaire et en présence de phospholipides procoagulants synthétiques.

La contamination plaquettaire dans les échantillons n'étant pas nulle, les suspensions plasmatiques de PN sont comparées non seulement avec le PDP autologue ayant servi à resuspendre les cellules, mais également avec du PPP autologue ajusté à 5 G/L en plaquettes, correspondant à la contamination plaquettaire moyenne des isolats.

Comme précédemment, l'influence de la préincubation avec du fMLP est également étudiée, ainsi que l'influence de la concentration en PN.

#### **C.II.3.2 Matériel et réactifs**

##### **☒ Calibrated Automated Thrombogram®**

- Ascent Fluoroskan (Thermo Lab system)
- Logiciel Thrombinoscope® version 3.0.0.29 (Thrombinoscope BV)
- PPP-LOW® reagent (Diagnostica Stago) : mélange de facteur tissulaire et de phospholipides, afin d'obtenir une concentration finale de 1 pM et 4 µM respectivement.
- Thrombin calibrator (Diagnostica Stago)
- Substrat fluorogénique Z-GGR-AMC (Bachem) : reconstitué et conservé en aliquotes à 100 nM dans DMSO. Préparation extemporanée à chaque utilisation.
- Tampon Fluobuffer : 20 mM HEPES ; BSA 60 g/L ; CaCl<sub>2</sub> 102 mM, pH=7,4
- FluCa : substrat fluorogénique resuspendu dans Fluobuffer, concentrations finales : Z-GGR-AMC 2,4 mM ; CaCl<sub>2</sub> 100 mM.
- Plaque 96 puits Immulon 2 HB (Diagnostica Stago)



☒ **Sang total issus de donneurs sains** prélevé à l'aide de tubes MONOVETTE® (Sarstedt), à partir duquel sont préparés (comme décrit précédemment) :

- Plasma citraté riche en PN (PN-RP) ajusté à 5, 10 et 15 G/L
- Plasma citraté riche en plaquettes (PRP) ajusté à 150 G/L
- Plasma citraté dépourvu en plaquettes (PDP)
- Plasma citraté pauvre en plaquettes (PPP) ajusté à 5 G/L en plaquettes par dilution du PRP avec le PDP autologue.

☒ **fMLP** (Sigma) solution mère à  $10^{-5}$  M dans DMSO. Dilution extemporanée dans du Tyrode glucosé.

### **C.II.3.3 Protocoles expérimentaux**

#### ***C.II.3.31 Général***

Immédiatement après isolement et ajustement aux concentrations cellulaires désirées (figure 27), 80  $\mu$ L d'échantillon (PN-RP ; PPP ou PDP) sont disposés dans une plaque 96 puits contenant 20  $\mu$ L de réactif PPP-LOW®. Les échantillons sont analysés en triple simultanément. A chaque puits mesure est associé au moins un puits calibrant contenant 80  $\mu$ L d'échantillon et 20  $\mu$ L de Thrombin calibrator (figure 28). L'enregistrement est déclenché après ajout de 20  $\mu$ L de FluCa contenant le substrat fluorogénique et le calcium, indispensable à la coagulation. Le signal fluorescent est mesuré toutes les 20 secondes pendant 60 min. A la fin de la mesure, pour chaque puits échantillon (en rouge dans le plan de plaque) les signaux de fluorescence sont convertis en concentration molaire de thrombine grâce aux puits calibrant associés (en jaune dans le plan de plaque), par l'intermédiaire du logiciel d'analyse Thrombinoscope®.

#### ***C.II.3.32 Influence de l'état d'activation des PN***

L'influence de l'état d'activation des PN sur la génération de thrombine est étudié en comparant le profil de PN-RP incubés avec du fMLP  $10^{-7}$  M (concentration finale) pendant 5 minutes à 37°C, avec celui de PN-RP seuls incubés à 37°C.

#### ***C.II.3.33 Influence de la concentration en PN***

Trois concentrations en PN issus du même isolement (5, 10 et 15 G/L) sont étudiées simultanément et leur impact sur la génération de thrombine est comparé.

### C.II.3.34 Analyse statistique

Les différents groupes sont comparés sur la base des moyennes  $\pm$  écart-type des potentiels thrombiniques endogènes (ETP), temps de latence et des pics de thrombine générée. Les groupes sont comparés deux à deux et analysés par le test de Wilcoxon, à l'aide du logiciel STATVIEW® 5.0.0.0. ; une valeur de  $p$  inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

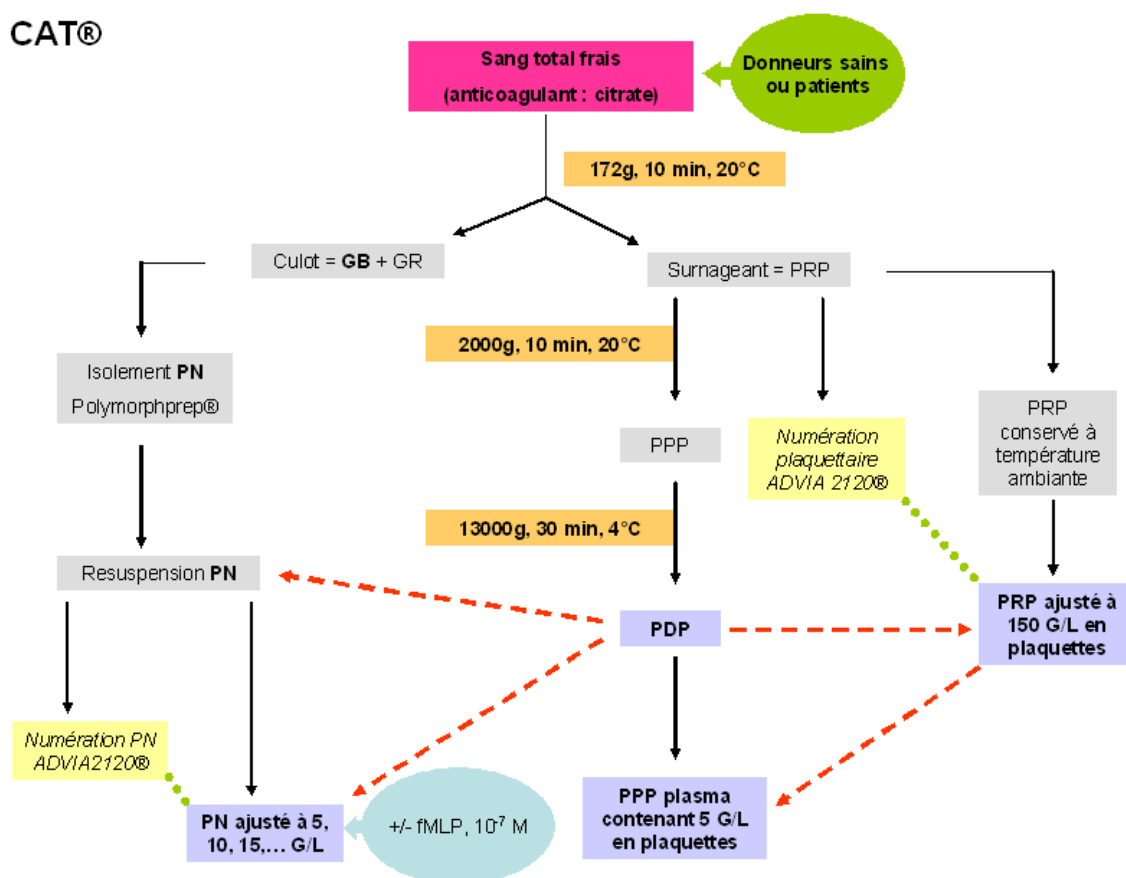


Figure 27 : Récapitulatif des protocoles expérimentaux (CAT®)

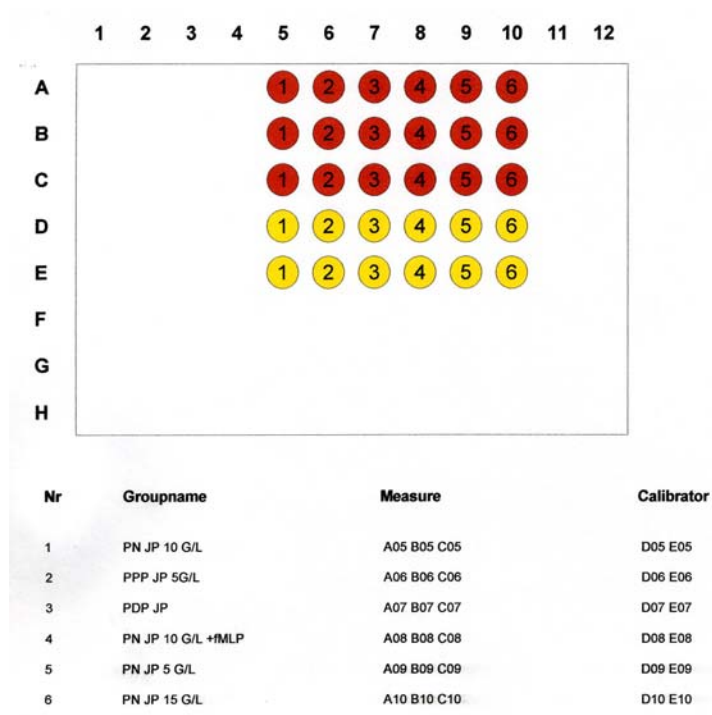


Figure 28 : Exemple de plan de plaque CAT® (puits rouge : échantillons ; puits jaune : calibrant)

### C.II.3.4 Résultats

#### C.II.3.41 PN-RP vs PPP vs PDP (N=10)

La présence de PN (10 G/L, concentration finale) dans du plasma pauvre ou dépourvu en plaquettes induit une modification du profil de génération de thrombine au cours du temps (figure 29). Il faut noter qu'il n'existe aucune différence statistiquement significative, quelque soit le paramètre étudié, entre le PPP 5 G/L et le PDP (tableau 10) ce qui suggère fortement que la faible présence de plaquettes dans le plasma n'influence pas la génération de thrombine dans nos conditions et n'est pas directement impliquée dans la modification du profil observé en PN-RP.

Toutes les variations des paramètres en PN-RP par rapport aux contrôles PPP et PDP vont dans le sens d'un effet procoagulant : délai avant génération explosive de thrombine raccourci, pic de thrombine et travail thrombinique total augmentés.

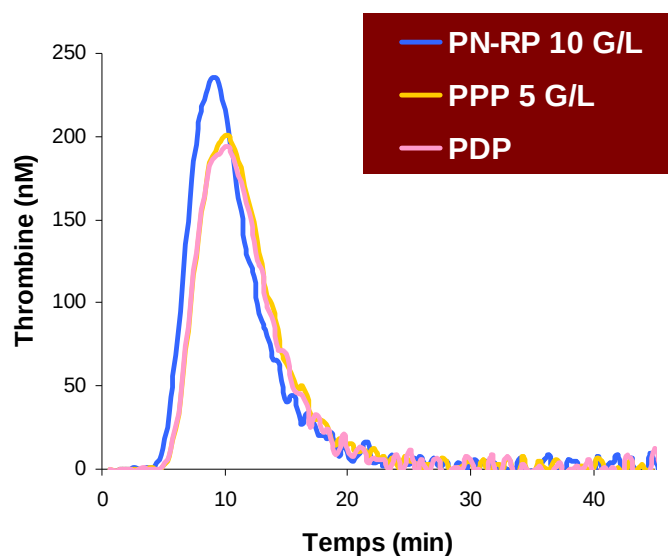


Figure 29 : Influence des PN sur la génération de travail thrombinique

Tableau 10 : Comparaison de l'effet de la présence de PN dans le plasma sur la génération de travail thrombinique (N=10 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type)

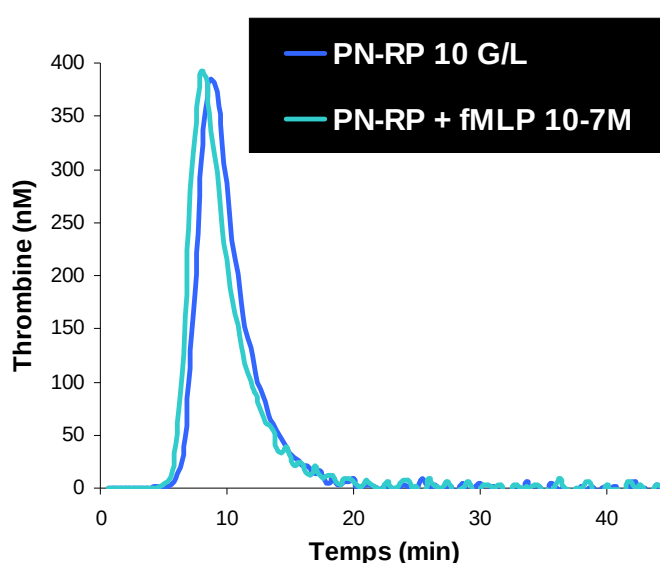
|                              | PN-RP<br>10 G/L | PPP<br>5 G/L   | PDP            | <i>P</i>        |                 |               |
|------------------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------|
|                              |                 |                |                | PN-RP<br>vs PPP | PN-RP<br>vs PDP | PPP<br>vs PDP |
| ETP<br>(nM.min)              | 2029<br>± 803   | 1579<br>± 581  | 1535<br>± 641  | <b>0,0051</b>   | <b>0,0051</b>   | 0,2135        |
| Temps de<br>Latence<br>(min) | 6,05<br>± 1,12  | 6,64<br>± 1,15 | 6,70<br>± 1,14 | <b>0,0050</b>   | <b>0,0068</b>   | 0,5738        |
| Pic de<br>thrombine<br>(nM)  | 297<br>± 118    | 194<br>± 81    | 183<br>± 72    | <b>0,0051</b>   | <b>0,0051</b>   | 0,2411        |

### C.II.3.42 Influence de l'état d'activation des PN (N=5)

L'incubation de la suspension de PN avec le fMLP  $10^{-7}$  M final avant déclenchement de la coagulation n'induit pas de modifications significatives du profil de génération de thrombine par rapport à celui obtenu avec les PN natifs. Toutefois, en analysant les données individuelles des 5 essais, on peut noter une tendance à la réduction du temps de latence (tableau 11 et figure 30).

**Tableau 11 : Comparaison de l'influence de l'état d'activation des PN sur la génération de travail thrombinique (N=5 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type)**

|                              | PN-RP<br>10 G/L | PN-RP<br>10 G/L<br>+ fMLP $10^{-7}$ M | <i>P</i> |
|------------------------------|-----------------|---------------------------------------|----------|
| ETP<br>(nM.min)              | 2479<br>± 904   | 2534<br>± 898                         | 0,5002   |
| Temps de<br>Latence<br>(min) | 6,45<br>± 1,40  | 6,03<br>± 1,07                        | 0,1441   |
| Pic de<br>thrombine<br>(nM)  | 388<br>± 94     | 396<br>± 99                           | 0,3452   |



**Figure 30 : Influence de la stimulation des PN par le fMLP sur la génération de travail thrombinique**

### C.II.3.43 Influence de la concentration en PN (N=6)

L'impact des PN sur la génération d'activité thrombinique apparaît « concentration dépendant », comme le montre la figure 31. Plus la concentration en PN augmente, plus l'effet procoagulant s'accroît, dont le retentissement principal se fait sur le pic de thrombine (tableau 12). L'ETP est également dépendant de la concentration en PN, mais il ne varie significativement qu'entre les concentrations extrêmes choisies : 5 G/L et 15 G/L. En revanche, le temps de latence ne varie pas de façon significative quelle que soit la concentration en PN.

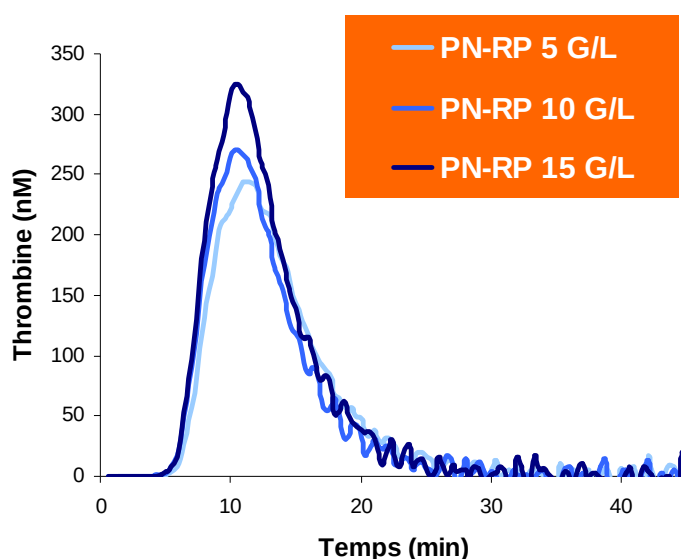


Figure 31 : Influence de la concentration en PN sur la génération de travail thrombinique

Tableau 12 : Comparaison de l'influence de la concentration en PN sur la génération de travail thrombinique (N=6 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type)

|                              | PN-RP<br>5 G/L | PN-RP<br>10 G/L | PN-RP<br>15 G/L | P                     |                       |                        |
|------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
|                              |                |                 |                 | 5 G/L<br>vs<br>10 G/L | 5 G/L<br>vs<br>15 G/L | 10 G/L<br>vs<br>15 G/L |
| ETP<br>(nM.min)              | 1998<br>± 669  | 2118<br>± 742   | 2197<br>± 691   | 0,1159                | <b>0,0464</b>         | 0,2489                 |
| Temps de<br>Latence<br>(min) | 6,41<br>± 1,80 | 6,28<br>± 1,67  | 6,28<br>± 1,67  | 0,2733                | 0,2249                | 0,4982                 |
| Pic de<br>thrombine<br>(nM)  | 284<br>± 89    | 313<br>± 80     | 334<br>± 88     | <b>0,0277</b>         | <b>0,0277</b>         | <b>0,0458</b>          |

### C.II.3.5 Discussion

#### *Considérations expérimentales*

L'influence des PN sur la coagulation a été étudiée ici sous l'angle de la génération de thrombine. Le plan expérimental est similaire à celui mis en place dans le chapitre précédent (Thromboélastométrie), à la différence près que pour des raisons techniques, le plasma riche en PN n'a pas été comparé au PRP autologue : l'objectif principal étant d'étudier l'impact de la présence de PN sur la génération de thrombine dans du plasma déplaqueté, la coagulation a donc été déclenchée par du FT en présence d'une concentration optimale en PL<sub>a</sub>. En outre, dans la méthode CAT®, les réactifs déclenchants diffèrent entre plasma pauvre et plasma riche en plaquettes (en PPP, le réactif contient FT et PL<sub>a</sub>, alors qu'il contient seulement du FT relipidé en PRP). La présence de PL<sub>a</sub> en quantité nécessaire et suffisante nous permet de minimiser l'impact éventuel d'une contamination par des phospholipides procoagulants d'origine plaquettaire ou provenant de microparticules d'origine diverse.

Aussi nous avons choisi de déclencher la génération de thrombine par une faible concentration en FT (1 pM), car dans ces conditions, le processus est particulièrement dépendant de la voie d'amplification, *via* la boucle de Josso, [Xi, 1989 ; Mann, 2003] et également car il est établi que plus la quantité de FT est faible, plus une variation (même minime) d'un ou plusieurs facteurs aura un retentissement appréciable sur le profil de génération de thrombine [Duchemin, 2008].

Pour résumer, dans notre système, l'influence des PN a été étudiée alors que tous les facteurs nécessaires au bon déroulement de la génération de thrombine sont déjà présents en quantité normale et suffisante : FT, PL<sub>a</sub> et facteurs de coagulation.

Nous avons testé le PDP natif, en principe exempt de plaquettes et de microvésicules autant que possible, par rapport à un PPP (qui n'est autre que le PDP auquel sont rajoutées des plaquettes à concentration finale de 5 G/L). L'analyse des paramètres CAT® montre qu'il n'existe aucune différence significative entre PDP et PPP. Ceci indique qu'une concentration résiduelle plaquettaire faible, comme c'est le cas dans nos isolats de PN, a très peu (voire pas du tout) d'impact sur la génération de thrombine dans nos conditions. Les effets observés dans le PN-RP sont directement imputables aux PN.

### ***Impact des PN sur la génération de thrombine***

Dans ce système d'étude globale de la coagulation, les PN font état d'une activité procoagulante avérée, qui se traduit par des modifications statistiquement significatives des paramètres de génération de thrombine : l'ajout de PN à 10 G/L dans le plasma aboutit à une augmentation du travail thrombinique total (ETP), du pic de thrombine et une diminution du temps de latence avant génération explosive de thrombine. Les PN sont donc capables d'améliorer la génération de thrombine, alors que celle-ci est déclenchée dans des conditions normales et que tous les facteurs nécessaires et suffisants à son bon déroulement sont présents dans le milieu réactionnel. L'activation préalable des PN par incubation avec le fMLP ne modifie pas de façon majeure cette activité. Toutefois, le nombre d'essais est restreint et il semble qu'il existe (au vu des résultats individuels de chaque essais) une tendance à la diminution du temps de latence quand les PN sont stimulés. Enfin, l'effet procoagulant apparaît comme concentration-dépendant. En effet, plus la concentration en PN dans le plasma augmente, plus le pic de thrombine atteint augmente. L'effet sur les autres paramètres est moins perceptible, peut-être du fait du faible nombre d'essais.

Dans nos conditions de déclenchement, les premières phases de la génération de thrombine étant sous la dépendance de la boucle de Josso, la diminution observée du temps de latence ne peut s'expliquer que par un renforcement soit de cette voie d'amplification soit de la voie du facteur tissulaire (apport de FT, activation du VII, production ou augmentation de la durée de vie du Xa), rendant le processus moins dépendant de cette boucle.

Aussi, d'une façon générale, les augmentations du pic et du travail thrombinique total au cours du temps ne peuvent être dues qu'à un allongement de la demi-vie de la thrombine générée puisque les conditions du test font que quasi toute la prothrombine est convertie en thrombine pendant le temps d'observation. Or, il ne peut pas y avoir « génération de prothrombine » permettant de générer plus de thrombine : ceci suggère qu'en présence de PN, les systèmes inhibiteurs de la thrombine sont moins efficaces et que la génération prend le pas sur l'inhibition.



## **Hypothèses**

Pour tenter d'expliquer, dans nos conditions, la plus importante génération de thrombine en présence de PN, plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

### ***Expression de FT par le PN ?***

Cette hypothèse apparaît peu probable. D'abord parce que dans nos conditions où la quantité de FT déclenchante est faible, la moindre activité supplémentaire contribuerait à diminuer le temps de latence avant génération explosive de façon importante (ce qui n'est pas le cas ici, car même si la diminution observée est statistiquement significative, la réduction du temps est tout de même modérée). Aussi si une activité FT était supportée par les PN, le temps de latence devrait varier lorsque les concentrations en PN augmentent, or ce n'est pas le cas non plus. Ensuite, la diminution s'observe bien que les PN soient au repos. Enfin, l'expression – déjà controversée – de FT par les PN n'a jamais été rapportée avec des populations cellulaires au repos mais uniquement après activation (voir partie bibliographique).

### ***Génération d'une surface procoagulante (exposition de PL<sub>a</sub>) ?***

Du fait de nos conditions expérimentales, cette hypothèse n'apparaît pas la plus plausible. En effet, la génération de thrombine a été déclenchée en présence de quantité optimale de PL<sub>a</sub> apportée par le réactif PPP LOW®. Puisque le réactif déclenchant apporte PL<sub>a</sub> en quantité suffisante, il apparaît peu probable que les PN apportent une surface phospholipidique procoagulante supplémentaire.

En revanche, il est possible que les PN favorisent la génération de thrombine par un « effet surface » autre. En effet ceux-ci possèdent des récepteurs pour FX et fibrin(ogène) (Mac1 ou CD11b/CD18) [Altieri & Edgington, 1988 ; Wright, 1988] ou encore pour le FXa (EPR-1) [Altieri, 1994], bien que l'existence de ce dernier soit remise en question [Zaman & Conway, 2000]. L'assemblage de la prothrombinase est possible à la surface des PN [Bouchard, 2003], ce qui pourrait contribuer à générer de la thrombine plus rapidement, et donc accélérer la phase d'initiation. Les PN sont capables de promouvoir la formation de fibrine à leur surface et le mécanisme est atténué en présence d'Ac anti-Mac1 [Goel & Diamond, 2001]. Enfin, la capacité des PN à se lier au fibrinogène et surtout à la fibrine pourrait conforter l'hypothèse formulée ci-dessus concernant la moindre efficacité des systèmes inhibiteurs : en effet, dans l'environnement cellulaire du PN-RP (contrairement au PPP et PDP), le fait que la fibrine et

le fibrinogène soient liés aux PN rendrait la thrombine formée *in situ* moins accessible à l'inhibition par l'AT.

### ***Intervention des molécules dérivées du PN : EROs, enzymes granulaires, ... ?***

Selon la littérature, les espèces radicalaires produites par le PN activés ont un rôle inactivateur sur les protéines de la coagulation, qui se traduit par un effet anticoagulant [Stief, 2000]. Mais aucune donnée n'est disponible sur une éventuelle dégradation/inactivation des inhibiteurs tels que le TFPI ou l'AT.

En revanche, de nombreuses enzymes granulaires sont susceptibles d'influer sur la génération de thrombine, notamment la Cath G et l'HNE, connues pour inactiver TFPI [Lwaleed & Bass, 2005] et AT [Jochum, 1981]. Toutefois, les PN font état d'une activité procoagulante au repos et l'activation par le fLMP ne l'améliore quasiment pas : soit cette activité ne dépend pas de l'activation des PN et de l'exocytose du contenu granulaire, soit les PN sont très rapidement activés après déclenchement de la coagulation, ce qui pourrait expliquer le fait que l'incubation avec le fMLP n'apporte rien de plus.

### ***Activation des PN lors de la coagulation***

Il est connu que la coagulation peut induire l'activation des PN [Plow, 1982]. L'HNE antigène, utilisée comme marqueur d'activation, augmente au cours de la coagulation en présence de PN, pour atteindre un maximum en 30 ou 40 minutes. Même si la thrombine interagit avec les PN, il semble qu'elle ne soit pas le médiateur de cette activation. Le fibrinogène et la fibrine formés sont en revanche de bons candidats : par leur interaction avec CD11b/CD18 à la surface granulocytaire, ils induisent de nombreuses modifications fonctionnelles cellulaires et notamment une dégranulation [Rubel, 2002 ; Flick, 2004]. Ces modifications sont très rapides car Tuluc a mis en évidence des variations des flux calciques et du calcium intracellulaire moins d'une minute après la mise en contact de PN avec du fibrinogène [Tuluc, 2004]. A côté de ceux-ci, il convient de mentionner que le FXIIa est également un activateur du PN [Wachtfogel, 1986]. Il est capable d'induire la dégranulation des PN jusqu'au stade final des grains azurophiles et donc de permettre la libération notamment d'HNE, et ce de façon très rapide, car dès 15 secondes, 40 % de la libération maximale est atteint (le maximum étant atteint en 90 min). Toutefois, la présence de XIIa dans le milieu suggèrerait que la voie contact a été activée dans nos conditions alors que l'implication significative de cette voie dans des essais de génération de thrombine en présence de plastique comme le polystyrène (plaques Immulon 2HB) est peu probable, surtout

dans les temps de latence relativement courts mesurés dans nos essais ; et l'ajout de CTI, pour l'empêcher, est une notion encore controversée [Luddington & Baglin, 2004 ; Spronk, 2009], même s'il semble que celui-ci ne soit nécessaire qu'à très faible concentration en FT, inférieure à 1 pM.



## MEMO

*Pour résumer, les PN font état d'une activité procoagulante claire, se traduisant par une diminution du temps avant génération explosive, augmentation du pic et du travail thrombinique total, par rapport au plasma natif. Cette activité procoagulante est concentration-dépendante, mais l'incubation préalable avec du fMLP semble peu influencer (si ce n'est sur l'initiation). L'augmentation du travail thrombinique total laisse penser que les systèmes inhibiteurs perdent en efficacité en présence de PN. Cet effet procoagulant peut être dû à l'assemblage de la prothrombinase à la surface granulocytaire (permettant une génération accrue de IIa), ainsi qu'aux interactions avec la(le) fibrin(ogène), d'une part à l'origine d'une activation des PN permettant la libération d'enzymes dégradant TFPi et/ou AT et d'autre part limitant l'inhibition de la thrombine par l'AT.*



## **Références**

- Altieri DC, Edgington TS. A monoclonal antibody reacting with distinct adhesion molecules defines a transition in the functional state of the receptor CD11b/CD18 (Mac-1). *J Immunol.* 1988;141:2656-60.
- Altieri DC. Molecular cloning of effector cell protease receptor-1, a novel cell surface receptor for the protease factor Xa. *J Biol Chem.* 1994;269:3139-42.
- Duchemin J, Pan-Petes B, Arnaud B, Blouch MT, Abgrall JF. Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Haemost.* 2008;99:767-73.
- Goel MS, Diamond SL. Neutrophil enhancement of fibrin deposition under flow through platelet-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:2093-8.
- Jochum M, Lander S, Heimburger N, Fritz H. Effect of human granulocytic elastase on isolated human antithrombin III. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1981;362:103-12.
- Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1954-9.
- Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol.* 2006;208:327-39.
- Mann KG. Thrombin formation. *Chest.* 2003;124:4S-10S.
- Plow EF. Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway. *J Clin Invest.* 1982;69:564-72.

- Rubel C, Fernández GC, Rosa FA, Gómez S, Bompadre MB, Coso OA, Isturiz MA, Palermo MS. Soluble fibrinogen modulates neutrophil functionality through the activation of an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway. *J Immunol.* 2002;168:3527-35.
- Spronk HM, Dielis AW, Panova-Noeva M, van Oerle R, Govers-Riemslog JW, Hamulyák K, Falanga A, Cate HT. Monitoring thrombin generation: is addition of corn trypsin inhibitor needed? *Thromb Haemost.* 2009;101:1156-62.
- Stief TW, Kurz J, Doss MO, Fareed J. Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood. *Thromb Res.* 2000;97:473-80.
- Tuluc F, Garcia A, Bredetean O, Meshki J, Kunapuli SP. Primary granule release from human neutrophils is potentiated by soluble fibrinogen through a mechanism depending on multiple intracellular signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C1264-72.
- Wachtfogel YT, Pixley RA, Kucich U, Abrams W, Weinbaum G, Schapira M, Colman RW. Purified plasma factor XIIa aggregates human neutrophils and causes degranulation. *Blood.* 1986;67:1731-7.
- Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC, Loike JD. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:7734-8.
- Xi M, Béguin S, Hemker HC. Importance of factor-IX-dependent prothrombinase formation-the Josso pathway-in clotting plasma. *Haemostasis.* 1989;19:301-8.
- Zaman GJ, Conway EM. The elusive factor Xa receptor: failure to detect transcripts that correspond to the published sequence of EPR-1. *Blood.* 2000;96:145-8.

## C.II.4- Conclusion

Les expérimentations réalisées dans ce travail montrent clairement que le PN, à l'état basal, est capable d'influer significativement sur la coagulation et la constitution du caillot de fibrine. Réputé pour être recruté dans le caillot afin de participer à sa lyse, le PN montre ici une capacité à favoriser sa constitution / formation, en induisant une diminution des temps de coagulation. Toutefois il n'apporte pas une solidité comparable à celle d'un caillot formé en milieu riche en plaquettes, ce qui était prévisible.

L'idée importante qui émerge de ces données est que les PN, ***en dehors de toute stimulation ou environnement pro-inflammatoire***, font état d'un potentiel procoagulant non négligeable de façon globale en accélérant le processus. Cette capacité est plus importante à mesure que la concentration en PN augmente et elle est encore améliorée quand les PN sont préalablement incubés avec le fMLP. Quel que soit le système d'étude choisi et les conditions de déclenchement, les PN permettent de raccourcir le temps de coagulation du plasma, suggérant une capacité à favoriser la production de facteur Xa. Toutefois, ce potentiel procoagulant n'est pas dû à une activité FT alors que de nombreux arguments convergent vers un rôle du contenu des granulations et une perte d'efficacité des systèmes inhibiteurs.

### **C.III. Etude de l'impact sur la coagulation des enzymes granulocytaires, Cathepsine G et élastase, par méthodes globales**



### C.III.1- Préambule

Les données expérimentales issues de la première partie confirment l'influence des PN sur la génération de thrombine et la constitution du caillot. Cet effet est plus marqué lorsque les PN sont préalablement activés par un stimulus adéquat. Puisque l'activation des PN aboutit à la libération du contenu granulaire dans le milieu extracellulaire et puisque la littérature cible principalement ces 2 sérine-protéases que sont la cathepsine G et l'élastase, comme étant au moins en partie responsables de l'activité des PN sur la coagulation, nous avons poursuivi nos expérimentations en utilisant ces 2 enzymes purifiées dans les mêmes systèmes d'études de la coagulation que précédemment, et évidemment en l'absence de quantités significatives de PN.

Afin de faciliter la compréhension de l'éventuelle activité des enzymes sur les mécanismes étudiés, nous avons choisi de conduire l'ensemble de nos expérimentations en présence d'une concentration unique et fixe, en l'une et l'autre des enzymes. Puisque notre réflexion repose sur le fait que les enzymes agissent après libération des PN activés, nous avons préalablement analysé les données de la littérature afin de déterminer les quantités et concentrations obtenues par libération. Selon Renesto, après activation *in vitro* des PN par du fMLP 0,5  $\mu$ M, les concentrations de Cath G et d'HNE dans le milieu extracellulaire s'élèvent respectivement à 240 et 380 nM [Renesto & Chignard, 1993]. D'autres auteurs ont également utilisé des concentrations voisines de celles-ci pour étudier l'action de Cath G [Goel & Diamond, 2003] et l'HNE [Samis, 1997] dans la coagulation. En conséquence, nous avons retenu ces 2 concentrations pour les différents protocoles.

## **C.III.2- Influence sur la constitution du caillot étudiée par Thromboélastométrie (ROTEM®)**

### **C.III.2.1 Objectifs**

Cette première série expérimentale a pour but d'évaluer l'effet d'une surcharge en Cath G ou en HNE, correspondant à la concentration libérée après activation de PN, dans du plasma issu de sujets sains, sur la cinétique de constitution du caillot de fibrine, à l'aide du système ROTEM®, précédemment décrit.

Dans un premier temps, l'étude de la cinétique de formation du caillot se fera comme dans la partie précédente sans utiliser de « déclencheur/accélérateur » de la coagulation, après recalcification simple du milieu et en présence de plaquettes, sources de surfaces phospholipidiques; ensuite, nous étudierons cette même cinétique après activation standardisée de la voie intrinsèque par l'acide ellagique, cette fois en l'absence de plaquettes, les phospholipides étant apportés par le réactif utilisé.

NB : comme précédemment le sang total à partir duquel seront préparés PRP et PPP, est issu de donneurs de sang, n'ayant pris aucun médicament interférant avec l'hémostase (aspirine et autres AINS), prélevés à l'EFS-Lorraine-Champagne, après consentement éclairé.

### **C.III.2.2 Matériel et réactifs**

☒ **ROTEM®** (Diagnostica Stago) :

- Appareillage et consommables
- STARTEM® : chlorure de calcium, 0,2 M
- INTEM® : phospholipides (extraits tissulaires de cerveau de lapin) et acide ellagique

☒ **Sang total issus de donneurs sains** prélevé à l'aide de tubes VACUTAINER® (Becton Dickinson), à partir duquel sont préparés (comme décrit précédemment) :

- Plasma citraté riche en plaquettes (PRP) ajusté à 150 G/L
- Plasma citraté dépourvu en plaquettes (PDP)

☒ **Cathepsine G granulocytaire humaine lyophilisée** (Sigma). Flacon conservé à - 80°C. Avant utilisation, décongélation 10 min à température ambiante et reconstitution dans de l'eau ultra-filtrée, afin d'obtenir une solution mère titrée à 3730 nM.

☒ **Elastase granulocytaire humaine lyophilisée** (Sigma). Flacon conservé à -80°C. Avant utilisation, décongélation 10 min à température ambiante et reconstitution dans de l'eau ultra-filtrée, afin d'obtenir une solution mère titrée à 6100 nM.

### **C.III.2.3 Protocoles expérimentaux**

#### ***C.III.2.31 Cinétique de formation du caillot après recalcification simple : NATEM®***

La solution mère d'enzyme fraîchement reconstituée est ajoutée à 300 µL de **PRP** frais afin d'obtenir une concentration finale en Cath G et en HNE, de 240 nM ou de 380 nM respectivement. Le mélange est ensuite incubé 5 minutes à 37°C dans la cupule de mesure ROTEM®. L'enregistrement de la mesure est déclenché après ajout de 20 µL de STARTEM® et poursuivi jusqu'à obtention de la fermeté maximale du caillot (MCF). Des essais préliminaires ayant montré qu'il n'y a pas de différence significative des paramètres ROTEM® entre le PRP natif et le PRP incubé avec l'eau ultra-filtrée, servant à reconstituer les enzymes, un contrôle est donc systématiquement réalisé, de façon parallèle et simultanée, avec le PRP natif (300 µL PRP + 20 µL STARTEM®).

#### ***C.III.2.32 Cinétique de formation du caillot après activation de la voie intrinsèque : INTEM®***

La solution mère d'enzyme fraîchement reconstituée est ajoutée à 300 µL de **PPP** afin d'obtenir une concentration finale en Cath G et en HNE, de 240 nM ou de 380 nM respectivement. Le mélange est ensuite incubé 5 minutes à 37°C dans la cupule de mesure ROTEM®. L'enregistrement de la mesure est déclenché après ajout de 20 µL de STARTEM® associé à 20 µL INTEM® et il est poursuivi jusqu'à obtention de la fermeté maximale du caillot (MCF).

#### ***C.III.2.33 Analyse statistique***

Pour chaque paramètre de mesure ROTEM® choisi, les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type de 5 essais indépendants, issus de donneurs différents et les groupes (plasma natif ; plasma + Cath G ; plasma + HNE) sont comparés deux à deux par le test de Wilcoxon à l'aide du logiciel STATVIEW® version 5.0.0.0.

Une valeur de *p* inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

### C.III.2.4 Résultats

#### C.III.2.41 Cinétique de formation du caillot après recalcification simple (N= 5)

Les paramètres moyens issus de 5 essais indépendants sont présentés dans le tableau 13. La figure 32 illustre un essai-type. Les résultats n'indiquent qu'un seul effet significatif de l'une comme de l'autre des 2 sérines-protéases granulocytaires : leur présence à la concentration de 240 nM (Cath G) ou de 380 nM (HNE) dans le plasma permet une accélération du temps de coagulation (CT), d'environ 2 minutes, ce qui retentit sur le temps d'obtention de la vélocité maximale (MAXV-t), également plus court. Les enzymes ont donc un effet procoagulant non négligeable dans ce système et il faut noter qu'il n'existe aucune différence entre les actions des 2 enzymes.

Pour ce qui est des autres paramètres, aucun effet net ne peut être dégagé. Toutefois, il semble que la Cath G induise un allongement du temps nécessaire pour obtenir la fermeté maximale du caillot (MCF-t) : presque 1 minute d'écart par rapport au témoin (cette tendance aurait probablement atteint le seuil de significativité avec une taille d'échantillon supérieure). Ceci laisse supposer que l'enzyme pourrait avoir un effet mixte, pro- et anticoagulant.

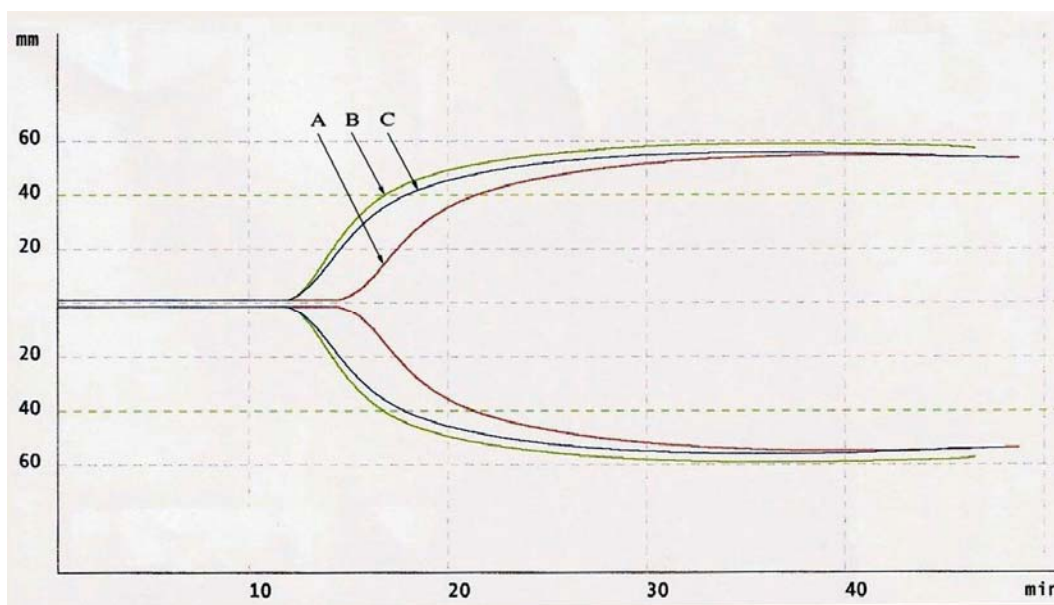


Figure 32 : Etude de l'influence de la cathepsine G et de l'élastase sur la coagulation en thromboélastométrie : exemples de TEMogram obtenus avec le test NATEM® (en PRP)

**Tableau 13 : Influence de la cathepsine G et de l'élastase sur les paramètres ROTEM® dans les conditions de test NATEM® (N=5 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type)**

|                               |                  | <b>Témoin</b>     | <b>Cath G</b><br><i>p vs témoin</i>    | <b>HNE</b><br><i>p vs témoin</i>       | <b>p</b><br><b>Cath G vs HNE</b> |
|-------------------------------|------------------|-------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|
| Profil<br>TEMogram<br>brut    | CT<br>(s)        | <b>774 ± 161</b>  | <b>643 ± 133</b><br><i>p = 0,0431</i>  | <b>648 ± 118</b><br><i>p = 0,0431</i>  | <i>p = 0,6845</i>                |
|                               | CFT<br>(s)       | <b>155 ± 38</b>   | <b>148 ± 50</b><br><i>p = 0,8927</i>   | <b>149 ± 32</b><br><i>p = 0,3430</i>   | <i>p = 0,8927</i>                |
|                               | MCF<br>(mm)      | <b>58 ± 5</b>     | <b>59 ± 7</b><br><i>p = 0,1756</i>     | <b>57 ± 6</b><br><i>p = 0,5775</i>     | <i>p = 0,1441</i>                |
|                               | MCF-t<br>(s)     | <b>1357 ± 184</b> | <b>1402 ± 171</b><br><i>p = 0,6858</i> | <b>1369 ± 172</b><br><i>p = 0,7865</i> | <i>p = 0,6858</i>                |
|                               | Alpha<br>(°)     | <b>61 ± 6</b>     | <b>63 ± 7</b><br><i>p = 0,2249</i>     | <b>62 ± 5</b><br><i>p = 0,3340</i>     | <i>p = 0,5002</i>                |
|                               | MAXV<br>(mm/min) | <b>9 ± 2</b>      | <b>11 ± 3</b><br><i>p = 0,2142</i>     | <b>10 ± 2</b><br><i>p = 0,0833</i>     | <i>p = 0,3363</i>                |
| Courbe<br>dérivée<br>première | MAXV-t<br>(s)    | <b>890 ± 178</b>  | <b>767 ± 177</b><br><i>p = 0,0431</i>  | <b>771 ± 136</b><br><i>p = 0,0431</i>  | <i>p = 0,9999</i>                |

#### **C.III.2.42 Cinétique de formation du caillot après activation de la voie intrinsèque (N=5)**

Lorsque la formation du caillot est déclenchée par activation standardisée de la voie intrinsèque en présence de phospholipides d'extraits tissulaires, la présence des 2 enzymes granulocytaires dans le plasma retentit à nouveau sur les profils obtenus (figure 33). Mais contrairement au test NATEM®, Cath G et HNE ont cette fois des actions significativement distinctes, ce qui se traduit dans le tableau 14 par 2 valeurs de  $p < 0,05$  (CT et MCF-t) entre Cath G et HNE, et une autre à la limite du seuil de significativité (MAXV-t).

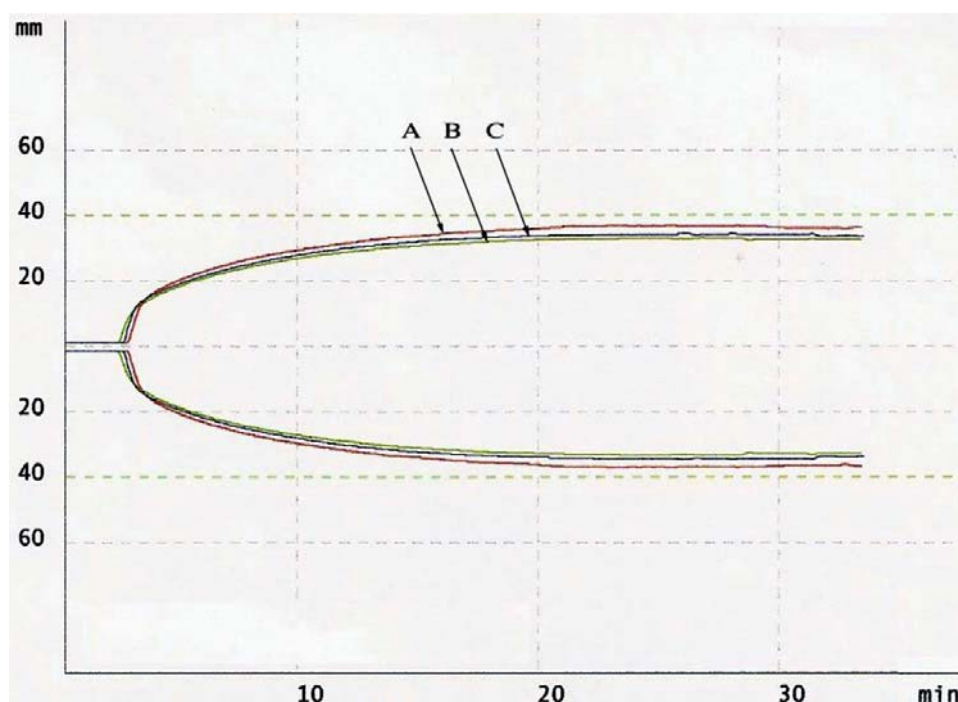
Concernant la Cath G, celle-ci est à nouveau capable de diminuer significativement le temps de coagulation (CT et MAXV-t) ; cependant, dans le même temps, elle induit un allongement du CFT et une tendance non significative à l'allongement du MCF-t (de l'ordre de 300 s, tout de même) qui traduisent un effet délétère sur la formation du caillot.

Cet effet préjudiciable sur la cinétique de formation du caillot est en revanche plus franc en ce qui concerne l'HNE : aucune modification du temps de coagulation n'est notée, mais plusieurs paramètres sont modifiés en présence d'HNE, dans le sens d'un effet délétère : le CFT, comme pour la Cath G, est significativement allongé, et on remarque deux tendances contraires, premièrement la diminution de la MCF associée deuxièmement à l'augmentation du temps pour l'atteindre (MCF-t).

Pour résumer, dans des conditions d'activation de la voie intrinsèque et en l'absence de plaquettes, l'HNE fait état d'une action anticoagulante, alors que la Cath G semble induire un phénotype double pro- et anticoagulant.

**Tableau 14 : Influence de la cathepsine G et de l'élastase sur les paramètres ROTEM® dans les conditions de test INTEM® (N=5 ; résultats exprimés en moyenne +/- écart-type)**

|                               |          | Témoin     | Cath G<br><i>p</i> vs témoin | HNE<br><i>p</i> vs témoin | <i>p</i><br>Cath G vs HNE |
|-------------------------------|----------|------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                               |          |            |                              |                           |                           |
| Profil<br>TEMogram<br>brut    | CT       | 153 ± 16   | 139 ± 10                     | 153 ± 22                  |                           |
|                               | (s)      |            | <i>p</i> = 0,0431            | <i>p</i> = 0,5002         | <i>p</i> = 0,0431         |
|                               | CFT      | 351 ± 169  | 422 ± 189                    | 418 ± 194                 |                           |
|                               | (s)      |            | <i>p</i> = 0,0431            | <i>p</i> = 0,0431         | <i>p</i> = 0,9999         |
|                               | MCF      | 32 ± 6     | 30 ± 3                       | 28 ± 6                    |                           |
|                               | (mm)     |            | <i>p</i> = 0,1797            | <i>p</i> = 0,0588         | <i>p</i> = 0,5809         |
|                               | MCF-t    | 1221 ± 168 | 1508 ± 89                    | 1383 ± 60                 |                           |
| Courbe<br>dérivée<br>première | (s)      |            | <i>p</i> = 0,0796            | <i>p</i> = 0,6858         | <i>p</i> = 0,0431         |
|                               | Alpha    | 78 ± 2     | 77 ± 2                       | 77 ± 3                    |                           |
|                               | (°)      |            | <i>p</i> = 0,0977            | <i>p</i> = 0,2579         | <i>p</i> = 0,9999         |
|                               | MAXV     | 21 ± 5     | 19 ± 3                       | 20 ± 5                    |                           |
|                               | (mm/min) |            | <i>p</i> = 0,1041            | <i>p</i> = 0,3573         | <i>p</i> = 0,7055         |
|                               | MAXV-t   | 162 ± 15   | 147 ± 9                      | 161 ± 21                  |                           |
|                               | (s)      |            | <i>p</i> = 0,0431            | <i>p</i> = 0,5002         | <i>p</i> = 0,0796         |



**Figure 33 : Etude de l'influence de la cathepsine G et de l'élastase sur la coagulation en thromboélastométrie : exemples de TEMogram obtenus avec le test INTEM® (en PPP).**

### C.III.2.5 Discussion

Nous avons utilisé les enzymes granulocytaires purifiées, Cath G et HNE, dans le même système d'étude de la coagulation que les PN issus de sujets sains (cf chapitre C.II). La surcharge en enzyme, réalisée *in vitro*, est comparable aux concentrations relevées après stimulation des PN et relargage de ces mêmes enzymes dans le milieu extracellulaire [Renesto & Chignard, 1993].

D'une manière générale, quelque fût notre façon de déclencher la coagulation, la Cath G ou l'HNE ont systématiquement induit une modification significative des profils « TEMograms » de plasma issus de sujets sains, indiquant clairement que celles-ci sont capables de moduler la cinétique de formation du caillot. Il est intéressant de noter que les 2 enzymes induisent des modifications de la cinétique de formation du caillot différentes et que certaines modifications de paramètres ROTEM® sont significatives malgré le faible nombre d'essais (N=5), ce qui suggère que les actions des 2 enzymes sont fortes et caractéristiques. En revanche, pour d'autres paramètres, seules des tendances non statistiquement significatives ont pu être mises en évidence, mais il est fort probable que l'augmentation des effectifs auraient amené à atteindre le seuil de significativité. Malheureusement, cela n'a pu être réalisé du fait de contraintes liées au recrutement régulier des donneurs, et à la disponibilité du dispositif.

La coexistence pour l'une et l'autre des enzymes d'effets antagonistes révélés en variant les conditions de déclenchement de la coagulation, suggère plusieurs points d'impact.

#### ***Un effet procoagulant : Diminution du CT***

En conditions identiques à celles utilisées pour étudier les PN dans la partie C.II, l'action principale des 2 enzymes est similaire aux PN, et réside en une réduction du temps de coagulation. Cette réduction est conséquente puisque d'environ 20 % (soit de l'ordre de 2 minutes). Cath G et HNE favorisent donc l'initiation du processus, par accélération de la formation des premiers filaments de fibrine.

Concernant la Cath G, on pourrait attribuer cet effet à une activation plaquettaire, bien documentée dans la littérature [Chignard, 1986 ; Cerletti, 1995 ; Si-Tahar, 1996]. Toutefois, cela ne constitue probablement pas le mécanisme principal car cette diminution du CT est également notée dans les conditions du test INTEM®, réalisé en l'absence de plaquettes. Cet effet procoagulant serait donc plutôt dû à une action ciblée sur les facteurs de la coagulation : activation directe de certains facteurs, mais cela est peu décrit dans la littérature (qui fait

plutôt état de dégradation par la Cath G, comme pour les facteurs vitamine K-dépendants [Turkington, 1992]) ; ou inversement, dégradation des inhibiteurs, et dans notre cas surtout du TFPI [Lawleed, 2006], puisque son effet cible en priorité l'initiation des mécanismes [Mann, 2003]. Même si dans les conditions du test NATEM®, la voie du facteur tissulaire n'est pas mise en jeu dans nos conditions (les seules cellules présentes sont les plaquettes qui expriment peu de FT [Muller, 2003]), l'hypothèse de l'action sur le TFPI est plausible car celui-ci, avant d'inhiber le complexe FT/VIIa au sein d'un complexe quaternaire en présence de Xa, est également capable d'inhiber le Xa seul et donc de ralentir la cinétique de la coagulation. En NATEM®, c'est principalement la voie contact qui permet le déclenchement de la coagulation. Mais celui-ci est lent car le plasma est en contact avec une surface peu activatrice (plastique de la cupule et du piston). Le déclenchement lent de la voie contact aboutit à la formation progressive de Xa par la tenase intrinsèque donc probablement plus facilement « inhibable » par le TFPI.

L'hypothèse d'une action délétère sur le TFPI est aussi valable pour expliquer l'action de l'HNE car celle-ci est capable de cliver l'inhibiteur entre les acides aminés Thr 87 et Thr 88, et de l'inactiver [Higuchi, 1992]. Cependant, la diminution du CT disparaît dans les conditions du test INTEM®, ce qui suggère plutôt un autre mécanisme : soit une activation directe plaquettaire, puisque l'effet visible en PRP disparaît en PPP ; soit une activation de la voie contact, qui accélérerait la génération de Xa en NATEM®, mais qui serait masqué en INTEM® du fait de l'activation plus forte par l'acide ellagique.

Concernant la première hypothèse, l'HNE n'est pas connue comme activatrice plaquettaire lorsqu'elle est isolée [Si Tahar, 1998] mais peut agir en synergie avec la Cath G, ce qui n'est pas le cas dans nos conditions [Renesto et Chignard, 1993]. Au contraire, l'HNE est plutôt connue pour interférer avec la fonctionnalité plaquettaire, en inactivant certains PARs plaquettaires [Ossovskaya, 2004].

Concernant la seconde hypothèse, l'HNE est connue pour avoir également une action délétère sur les molécules majeures du système contact : en effet, l'incubation d'enzyme purifiée avec du plasma de donneurs aboutit à une perte d'activité des FXII, FXIIa, prékallicréine, kallicréine et kininogène de haut poids moléculaire [Yarovaya, 2002].

Ainsi on peut imaginer que l'HNE dégrade en même temps TFPI **et** facteurs de la voie contact, ce qui pourrait expliquer la non-modification du CT en INTEM par combinaison de 2 effets qui s'annulent.



### ***Un effet anticoagulant : altération de la cinétique de formation du caillot***

Pour poursuivre, une donnée particulièrement intéressante est que, à côté de cet effet procoagulant, coexiste un effet inverse, anticoagulant. Cela est surtout visible en INTEM, où la Cath G tout comme l'HNE, modifient le temps de formation du caillot (CFT) et les paramètres liés à la fermeté maximale. Ainsi, non seulement le caillot met plus longtemps « à s'organiser » (après le temps de coagulation), mais aussi, celui-ci apparaît moins ferme. Le CFT est le reflet de l'interaction entre les plaquettes, le fibrinogène et le réseau de fibrine en cours de constitution. Or, dans les conditions utilisées pour le test INTEM, les plaquettes sont absentes. En conséquence, Cath G et HNE ont probablement une action sur la cinétique de conversion du fibrinogène en fibrine. Concernant l'HNE, l'explication la plus probable est une dégradation du fibrinogène par celle-ci, qui est décrite par plusieurs auteurs [Rulot, 1904 ; Plow, 1982]. Ainsi, la compétition entre HNE et thrombine pour le fibrinogène, ralentirait la conversion en fibrine, d'où les allongements des CFT et MCF-t, mais aussi, conduirait à une MCF moindre par rapport au témoin suite à la baisse de concentration plasmatique en fibrinogène par la dégradation par l'HNE.

Toutefois, pourquoi, dans ces conditions, l'effet ne serait-il pas observé en NATEM® ? l'hypothèse la plus vraisemblable, est que la présence de plaquettes dans le test NATEM® compense, en terme de solidité du caillot, la dégradation du fibrinogène par l'HNE, ne modifiant pas la MCF.

Concernant la Cath G, une action sur le fibrinogène est moins plausible, d'une part parce que cela n'est pas rapporté dans la littérature, d'autre part parce qu'il semble que c'est la cinétique elle-même qui est affectée plutôt que le fibrinogène. En effet, la MCF n'est jamais modifiée et ce sont plutôt les paramètres CFT et MCF-t qui s'allongent. A ce stade des expérimentations, il est difficile d'émettre des hypothèses précises sur le(s) mécanisme(s) en jeu, même si à nouveau, il est fort probable que cela affecte la cinétique de conversion du fibrinogène en fibrine par la thrombine.

Il faut toutefois tempérer ces remarques car les modifications délétères du caillot, même si elles sont statistiquement significatives, restent relativement minimes, comme l'atteste l'examen visuel des TEMograms obtenus.



## MEMO

*Les 2 sérine-protéases granulocytaires, Cathepsine G et élastase, lorsqu'elles sont présentes dans le plasma à concentrations proches de celles mesurées après libération par les PN activés, modifient significativement la cinétique de formation du caillot. Si chacune des 2 enzymes possède un effet qui lui est propre, toutes deux induisent des modifications allant à la fois dans le sens pro- et anticoagulant. Une activation plaquettaire est peu probable. La réduction du temps de coagulation en présence de Cath G ou d'HNE suggère une dégradation du TFPI, alors que les effets délétères de l'HNE peuvent être imputés à une dégradation du fibrinogène, alors que ceux induits par la Cath G restent difficiles à interpréter.*



## Références

- Cerletti C, Evangelista V, Molino M, de Gaetano G. Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb Haemost.* 1995;74:218-23.
- Chignard M, Selak MA, Smith JB. Direct evidence for the existence of a neutrophil-derived platelet activator (neutrophilin). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:8609-13.
- Goel MS, Diamond SL. Neutrophil cathepsin G promotes prothrombinase and fibrin formation under flow conditions by activating fibrinogen-adherent platelets. *J Biol Chem.* 2003;278:9458-63.
- Higuchi DA, Wun TC, Likert KM, Broze GJ Jr. The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood.* 1992;79:1712-9.
- Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol.* 2006;208:327-39.
- Mann KG. Thrombin formation. *Chest.* 2003;124:4S-10S.
- Müller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* 2003;17:476-8.
- Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:579-621.
- Plow EF. Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway. *J Clin Invest.* 1982;69:564-72.
- Renesto P, Chignard M. Enhancement of cathepsin G-induced platelet activation by leukocyte elastase: consequence for the neutrophil-mediated platelet activation. *Blood.* 1993;82:139-44.

- Rulot H. Intervention des leucocytes dans l'autolyse de la fibrine. Arch Int Physiol Biochim. 1904;1:152-8.
- Samis JA, Kam E, Nesheim ME, Giles AR. Neutrophil elastase cleavage of human factor IX generates an activated factor IX-like product devoid of coagulant function. Blood. 1998;92:1287-96.
- Si-Tahar M, Pidard D, Chignard M. Le dialogue neutrophiles-plaquettes. Hématologie. 1998;4:449-52.
- Turkington PT. Cathepsin G, a regulator of human vitamin K, dependent clotting factors and inhibitors. Thromb Res. 1992;67:147-55.
- Yarovaya GA, Blokhina TB, Neshkova EA. Contact system. New concepts on activation mechanisms and bioregulatory functions. Biochemistry (Mosc). 2002;67:13-24.

## **C.III.2- Influence sur la génération de thrombine étudiée par thrombinographie (CAT®)**

### **C.III.2.1 Avant-propos et objectifs**

Le but de cette série d'expérimentations est de poursuivre l'étude de l'impact de la Cath G et de l'HNE sur la coagulation sous l'angle cette fois de la génération de thrombine. Les conditions d'utilisation des 2 enzymes sont identiques à celles décrites dans la partie précédente, à savoir une concentration unique (240 nM et 380 nM, respectivement) dans différents milieux plasmatiques.

Les effets sur la coagulation de la Cath G et de l'HNE ont d'abord été étudiés :

- dans du PRP frais, PDP, PRP après un cycle de congélation/décongélation, issus de donneurs sains
- puis dans du plasma humain déplété sélectivement en un facteur de coagulation, de source commerciale ou issus de patients (hémophiles A ou B).

La génération de thrombine par la méthode CAT® a été déclenchée par différentes concentrations en FT et PL<sub>a</sub> en fonction des milieux plasmatiques (0, 0,5 ou 1 pM).

Pour des raisons de lisibilité, l'étude de chaque enzyme sera présentée de façon indépendante. Les travaux issus de l'étude de la Cath G ont fait l'objet d'une soumission pour publication dans la revue *Thrombosis & Haemostasis* et présentés comme tel. Les travaux concernant l'HNE sont en cours de rédaction pour une future soumission et sont donc également présentés sous la forme du manuscrit.

### **C.III.2.2 Effects of human neutrophil cathepsin G on in vitro coagulation: both accelerated thrombin generation and decreased thrombin work.**

**Julien Perrin<sup>1,2</sup>, Thomas Lecompte<sup>1,3</sup>, Agnès Brunette<sup>3</sup>, Lise Morlon<sup>1</sup>, Monique Marchand-Arvier<sup>1</sup>, Claude Vigneron<sup>1,2</sup>.**

<sup>1</sup> Hématologie biologique, Pôle laboratoires, CHU Nancy, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy, France

<sup>2</sup> EA3452, Faculté de Pharmacie, Nancy Université, France

<sup>3</sup> Inserm U961

#### **Corresponding author:**

Julien PERRIN

Hématologie Biologique, CHU Nancy

Allée du Morvan,

54511 Vandoeuvre-les-Nancy, France

e-mail: [julien.perrin@chu-nancy.fr](mailto:julien.perrin@chu-nancy.fr)

tel: +33 3 83 15 39 79

fax number: +33 3 83 15 37 89

#### **Summary**

Cathepsin G (Cath G), a serine-protease found in neutrophils, has been reported to both facilitate coagulation and impede fibrin formation. Thrombin generation (CAT method) was chosen to study its overall effect on coagulation, at a plasma concentration (240 nM) corresponding to that measured after neutrophil activation. Coagulation was triggered by a low concentration of tissue factor in the presence or absence of platelets. To further help identify a potential main target of Cath G, plasmas depleted in clotting factors or inhibitors were used. Cath G induced a puzzling combination of two effects on thrombin generation: accelerating the process (decreased clotting time, up to 30 %), and impeding it at the same time since thrombin peak and ETP (total thrombin work) were decreased, up to 45 and 12 % respectively, suggestive of deficient prothrombinase. This is consistent with Cath G having at least two targets among the coagulation cascade. Our data indicate that coagulation speeding can be attributed neither to platelet activation and nor to activation of a clotting factor. When

TFPI was absent, no effect on lag time was observed indicating that Cath G rather enhances factor Xa production by reducing the activity of this inhibitor. The anticoagulant activity of TFPI was indeed found decreased in the presence of the enzyme. Furthermore, indirect evidence, consistent with literature, suggests that the anticoagulant effect is due to action on factor V. To what extent this explains the association of neutrophils with thrombo-haemorrhagic complications of sepsis and myeloproliferative disorders remains to be studied.

**Keywords:** Cathepsin G, thrombin generation, TFPI, factor V

### ***Introduction***

Inflammation and thrombosis are interrelated (1 - 3). Proteins involved in the coagulation cascade, such as thrombin (4) or factor Xa (5), modulate inflammatory response or interact with inflammatory cells. Conversely, inflammation mediators can modulate coagulation. However, by contrast to monocytes/macrophages, which promote coagulation *via* TF expression (6), the contribution of PMN to haemostasis remains largely unknown, although these cells have been reported to influence fibrin clot formation (7). Many hypotheses have been put forward to explain the involvement of leukocytes in haemostasis. More particularly, attention has been focused on the implication of enzymes stored in the azurophilic neutrophil granules. Among them is cathepsin G (EC 3.4.21.20 - Cath G), a 30 kDa glycoprotein serine-protease that belongs to the chymotrypsin family (8). Upon stimulation, Cath G is localized on the cell membrane or released into extracellular matrix or blood (9).

There are many possible targets for this enzyme. First of all, Cath G is a platelet agonist (10 - 13). Platelet activation is attributed to Cath G interaction with PAR-4 expressed on the platelet membrane (14). However, Cath G is also capable to disable human PAR-1 (thrombin platelet receptor) thus impairing thrombin action (15). Second, the enzyme can act on many proteins of the coagulation cascade, suggesting a modulation of thrombin generation: Cath G has been shown to remove the calcium-binding domain (Gla-domain) of all vitamin K-dependent clotting factors, ie factors II, VII, IX, X, protein C (PS) and protein S (PS), and thereby inactivate them (16). Furthermore, the enzyme can cleave human  $\alpha$ -thrombin, leading to  $\zeta$ -thrombin, which is less active on fibrinogen and less stable (17). Cath G has been reported to inactivate one of the main inhibitor of coagulation process, Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), by formation of numerous fragments (18). Finally, Cath G is able to degrade factor XIII, resulting in a more fragile fibrin clot (19). On the other hand, there might also be

activating proteolyses, since for instance it has been reported that the enzyme can cleave and activate factor V (20,21) and more recently, factor VIII as well, with minimal inactivating effects on thrombin-activated FVIII (22). As both these factors are critical for thrombin generation, Cath G could also accelerate coagulation.

Thus assessment of the net result of the numerous reported effects of Cath G on coagulation is of interest since it acts both as a procoagulant and an anticoagulant. We have now a tool to do this, since the study of *in vitro* thrombin generation has been much improved (23) to allow 1) quasi continuous *in situ* measurement of thrombin work over time; 2) study without defibrination steps; and most importantly 3) study with platelets or leucocytes. The CAT method (Calibrated Automated Thrombogram) uses a fluorogenic substrate and an appropriate treatment of the fluorescent signal in order to get the whole thrombin course in adequately stimulated plasma (24). Given that over 95% of the thrombin work is generated after plasma clotting, this assay can provide an overview of the coagulation process in the presence of blood cells.

The present study aimed at assessing the overall impact of Cath G on thrombin generation. Thus, plasmas (with or without platelets) from healthy volunteers were spiked with a fixed concentration of Cath G corresponding to the one measured after PMN activation and degranulation (25). In order to get further insight in a potential main target of Cath G, plasmas selectively depleted in clotting factors or inhibitors were used.

## **Materials and methods**

In order to characterize the effect of Cath G on normal plasmas, we used blood from 15 healthy volunteers (who had not taken any medication interfering with coagulation and gave informed consent) to obtain platelet-rich plasma (PRP), plasma with platelet membranes (PPM) and platelet-depleted plasma (PDP).

### *1) Normal plasma preparation*

#### *Platelet-rich plasma (PRP)*

Whole blood (15 mL) from healthy volunteers was withdrawn by antecubital venipuncture and anticoagulated with trisodium citrate 0.106 M (9:1 vol/vol), using S-Monovette® system (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Platelet-rich plasma (PRP) was obtained after centrifugation at 172g for 10 minutes at room temperature (no brake). Supernatant (PRP) was removed and platelet count was obtained with ADVIA2120® (Siemens medical solutions diagnostics, Saint-Denis, France). Platelet count was adjusted to



$150 \times 10^9$  platelets/L with autologous platelet-depleted plasma prepared as described below. Samples were tested within 60 minutes after blood collection and 30 minutes after PRP preparation.

#### *Platelet-depleted plasma (PDP)*

Platelet-poor plasma was prepared after a second centrifugation of whole blood tubes at 2000g for 10 minutes at room temperature. Supernatant was removed and PDP was then obtained after centrifugation at 13000g for 30 minutes at 4°C, to remove as many platelets and microvesicles as possible.

#### *Plasma with platelet membranes (PPM)*

Plasma with platelet membranes was prepared from PRP aliquots that were kept frozen at -80°C after adjustment to  $150 \times 10^9$  platelets/L. Before use, aliquots were thawed at 37°C for 10 minutes, mixed with Vortex and tested within 30 minutes. In the resulting plasma, platelets are no longer activatable, but provide natural phospholipid membranes suitable for coagulation to proceed (26 - 28).

#### *2) Human coagulation factor-depleted plasmas preparation*

Several commercially available coagulation factor-depleted plasmas were used, from 2 different manufacturers or, if not available, 2 different batches of the same manufacturer, in order to circumvent a potential plasma alteration due to preparation procedure. All plasmas were prepared according to manufacturer's instructions; similarly to PDP preparation, an additional centrifugation at 13000g for 30 minutes at 4°C was performed.

Factor X- and factor V-depleted plasmas were purchased from Diagnostica Stago (Asnières, France) and Dade Behring (Marburg, Germany). Factor VIII- and factor IX-depleted plasmas were from Dade Behring (Marburg, Germany). Factor XII-depleted plasma was from Hart Biologicals (Hartlepool, UK) and Dade Behring (Marburg, Germany). Antithrombin-depleted plasma was from Kordia (Leiden, the Netherlands). TFPI-depleted plasma was from American Diagnostica (Stamford, USA).

In addition, plasma (PDP) was prepared (as described above) from patients with severe haemophilia A or B (FVIII or FIX < 1% respectively), after informed consent.

### 3) Cathepsin G

Purified human Cath G was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and diluted with ultra-filtered water to the concentration of 3730 nM. Plasma samples prepared as described above were then spiked with Cath G (final concentration 240 nM, previously reported to be released by *in vitro* activated PMN (25)). A control with vehicle alone was run in parallel.

### 4) Thrombin generation assay

Thrombin generation was studied using CAT method, essentially as previously described (24,26). Briefly, 80 µL plasma samples were mixed with 20 µL triggering reagent (see below) into a 96-well plate (Immulon, 2HB clear U-bottom, Thermo Electron, Villebon-sur-Yvette, France). Coagulation was triggered by adding 100 mM calcium chloride (20 µL) in a home-made BSA buffer containing 2.4 mM Z-Gly-Gly-Arg-AMC (the fluorogenic substrate). Upon splitting by thrombin, the fluorescent AMC (7-amino-4-methylcoumarin) is released and measured with a 390-nm-excitation and a 460-nm-emission filter set in an Ascent Fluoroscan® (ThermoLabsystems, Helsinki, Finland). Fluorescence was recorded for 90 minutes. All samples were run in triplicate. For each plasma sample (Cath G-spiked or control), the fluorescence signal was corrected for substrate consumption, plasma colour variability and inner filter fluorescence effect by running in parallel 2 duplicate calibrating wells where 80 µL plasma sample was mixed with 20 µL Thrombin Calibrator® from Thrombinoscope BV (Maastricht, The Netherlands).

Final concentrations of tissue factor and phospholipids varied according the plasma sample tested:

- PRP and PPM: the triggering reagent was Innovin® (human recombinant tissue factor (rhuTF) from Dade Behring, Marburg, Germany) diluted with home-made HBS buffer; estimated final concentration: 0.5 pM (26).

- PDP and coagulation factor-depleted plasmas: the triggering reagent was PPP LOW® (Diagnostica Stago, Asnières, France); final concentrations: rhuTF= 1 pM, phospholipids= 4 µM. Thrombin generation in factor XII-depleted plasma was also studied in the presence of phospholipids 4 µM only (no TF), using MP Reagent® (Diagnostica Stago, Asnières, France).

Fluorescence data were then analysed with the Thrombinoscope® software version 3.0.0.29 (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands). The following parameters were recorded:

- Endogenous thrombin potential (ETP): area under the curve, which stands for the total amount of thrombin work generated over the time, during the whole process of coagulation. Several lines of evidence indicate that ETP is an expression of the global coagulation potential of an individual, reflecting hypo- or hypercoagulability (28 - 32).

- Lag time: time to burst of thrombin generation, which roughly represents the clotting time.

- Thrombin peak: the highest thrombin concentration reached during the time course of thrombin formation and inhibition. Several studies suggest this parameter is particularly sensitive to any factor decrease (33,34), making it relevant for our study purpose.

#### 5) *TFPI anticoagulant activity assay*

Evaluation of the TFPI anticoagulant activity was performed in normal plasmas (PDP), in the presence and absence of Cath G 240 nM, as adapted from the method of Dahm (35). Briefly, normal plasmas were incubated for 10 min at 37°C with Cath G or vehicle. A second incubation with rabbit anti-human TFPI Ig G (American Diagnostica, Stamford, USA) or Tris-buffered saline was then performed for 5 min at 37°C. Clotting time was noted after addition of rhuTF (Innovin®, Dade Behring, Marburg, Germany) and calcium chloride. Anticoagulant activity of TFPI was evaluated by the following ratio: coagulation time without anti-TFPI Ig G / coagulation time with anti-TFPI Ig G.

#### **Statistical analysis**

The effect of Cath G on thrombin generation was analysed *versus* control using the Wilcoxon signed-rank test. A p-value < 0.05 was considered as statistically significant.

## Results

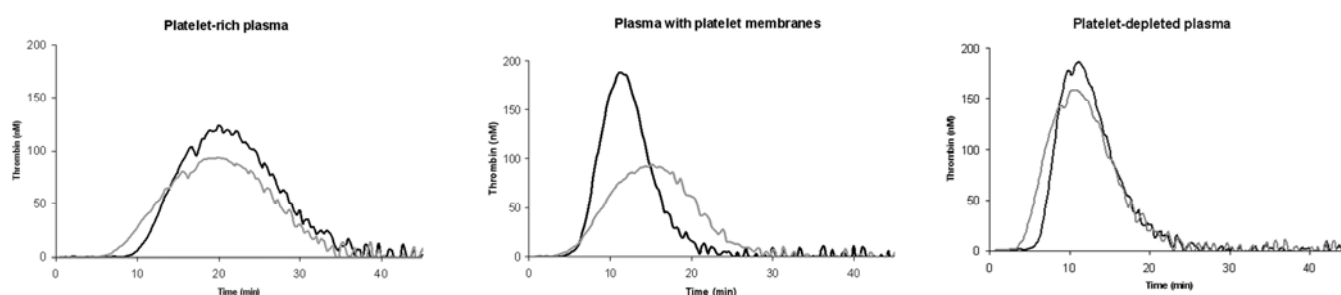
### 1) Influence of Cath G on thrombin generation in plasma from healthy volunteers

Spiking of PRP (N=10) with Cath G 240 nM led to significant modifications of thrombin generation profiles, as shown in Figure 34 and Table 15a. The enzyme induced indeed a significant decrease in all thrombogram parameters ie lag time, ETP and thrombin peak. Interestingly, this indicated a puzzling combination of two opposite effects – pro- and anticoagulant – detected under the same experimental conditions, during the same thrombin generation time-course. Similar results were obtained in the presence of platelet membranes (PPM, N=9) obtained after freeze-thawing of PRP, (Figure 34 and Table 15b), whereas with artificial phospholipids vesicles added to PDP (N=10) the only statistically significant effect of Cath G was a decrease in lag time (Figure 34 and Table 15c). Of note, when thrombin generation was decreased, the thrombin peak was more reduced the ETP; this is conspicuous when studies were performed with PPM.

Tableau 15 : Effects of Cath G on thrombograms parameters in normal plasmas. Results are presented as mean  $\pm$  SD;

PRP N=10, PPM N=9, PDP N=10.

|               |                | <b>Cath G -</b>  | <b>Cath G +</b> | <b>p</b>      |
|---------------|----------------|------------------|-----------------|---------------|
| <b>a. PRP</b> | ETP (nM.min)   | 1540 $\pm$ 357   | 1404 $\pm$ 382  | <b>0.0051</b> |
|               | Lag Time (min) | 11.68 $\pm$ 1.40 | 9.56 $\pm$ 0.89 | <b>0.0051</b> |
|               | Peak (nM)      | 98 $\pm$ 22      | 91 $\pm$ 22     | <b>0.0367</b> |
| <b>b. PPM</b> | ETP (nM.min)   | 1665 $\pm$ 373   | 1461 $\pm$ 348  | <b>0.0077</b> |
|               | Lag Time (min) | 6.02 $\pm$ 0.52  | 5.58 $\pm$ 0.46 | <b>0.0115</b> |
|               | Peak (nM)      | 200 $\pm$ 41     | 108 $\pm$ 29    | <b>0.0077</b> |
| <b>c. PDP</b> | ETP (nM.min)   | 1448 $\pm$ 279   | 1446 $\pm$ 318  | 0.9594        |
|               | Lag Time (min) | 5.55 $\pm$ 1.65  | 3.82 $\pm$ 0.80 | <b>0.0051</b> |
|               | Peak (nM)      | 174 $\pm$ 67     | 163 $\pm$ 60    | 0.2845        |



**Figure 34 : Typical impact of Cath G on thrombin generation in normal plasmas.**  
Black: Control; Grey: Cathepsin G

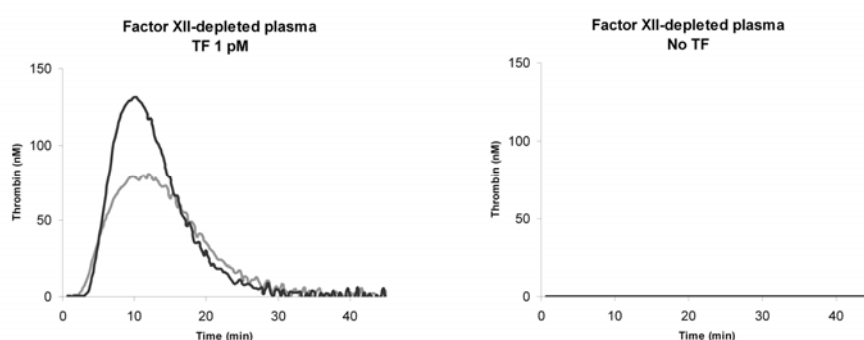
## 2) Influence of Cath G on thrombin generation in plasmas selectively depleted in human coagulation factors

Experiments performed with factor XII-depleted plasmas are shown in Figure 35. When coagulation was triggered by TF in these factor XII-deficient plasmas, a decrease in lag time was still noted. Thus there was no involvement of the contact phase in the shortening of the lag time in the presence of Cath G. Of note, a decrease in thrombin peak was also observed reflecting the anticoagulant potency of Cath G. Moreover, in the absence of added TF, no thrombin generation at all could be detected, indicating the enzyme cannot trigger by itself the coagulation process, by direct activation of one or several of the zymogens downstream the contact phase and TF. Cath G was not able to induce thrombin generation in factor V- or factor X-depleted plasma, which were as expected unclottable; this confirms that the enzyme did not directly convert prothrombin to thrombin at a detectable level (Figure 36).

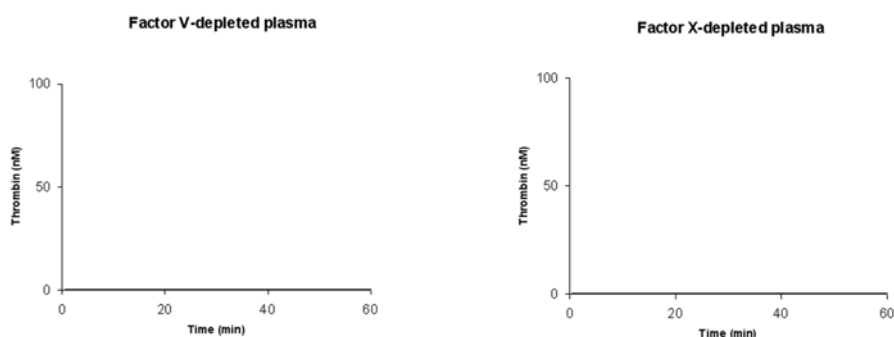
In order to gain further insight into the mechanism of Cath G-induced acceleration of the thrombin burst, we also used plasmas deficient in anti-haemophilic factors, either artificially depleted or prepared from patients with severe haemophilia A or B. Indeed at low TF concentration, explosive thrombin generation depends, at least in part, on factor Xa production by intrinsic tenase (Factor VIIIa/Factor IXa) assembled on phospholipid surfaces as can be seen from the tracings shown in figure 37. In the absence of factor VIII or IX, Cath G induced a decrease in lag time and facilitated the explosive formation of thrombin. Thrombin peak did not reach normal levels however (174 nM in normal PDP – table 15), showing that the enzyme could not fully restore normal thrombin generation.

We next addressed the role of changes in physiologic inhibitors by using the same approach of plasmas depleted electively in natural anticoagulants. In TFPI-deficient plasma, the effect of Cath G on lag time was no longer evidenced but a reduction in thrombin peak

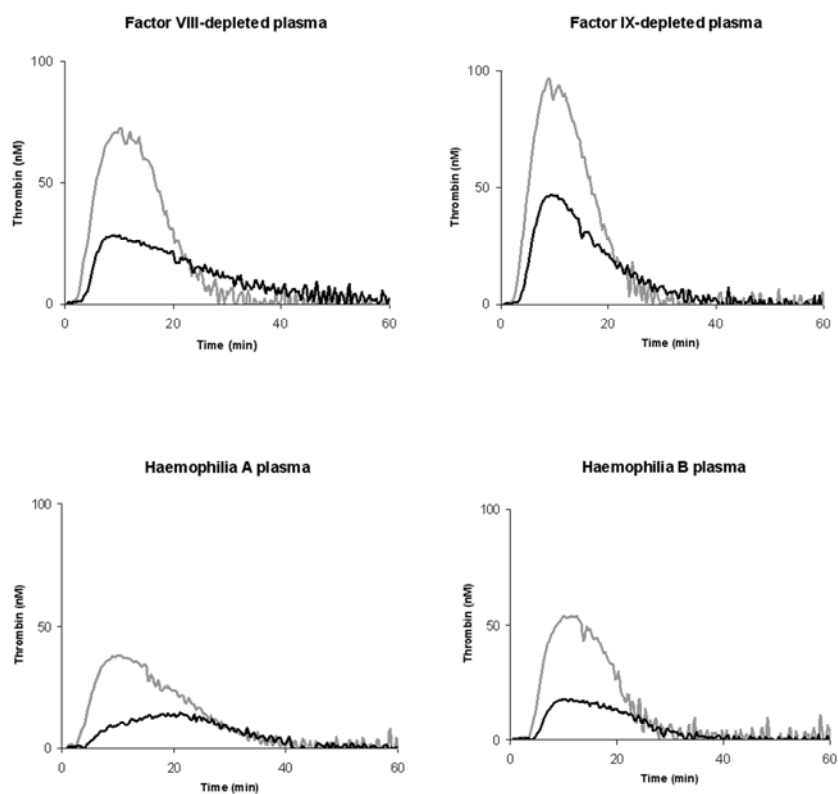
could be still noticed (Figure 38): no procoagulant effect could be seen in the absence of TFPI. No thrombogram from AT-deficient plasma experiments could be obtained. Indeed, because of AT absence, the fluorescent signal was higher than in the calibrator well, due to the persistent thrombin effect, with complete consumption of the fluorogenic substrate. The signal could not be converted to thrombin concentration by the Thromboscope® software. However, visual inspection of raw fluorescent data remained possible (Figure 39): it appeared that the signal obtained in the presence of Cath G was not superimposed with that in its absence. Thus, Cath G modified thrombin generation kinetics even in the absence of AT. Since fluorescence was detected earlier in the presence of Cath G, it can be concluded that the duration of initiation phase was shorter, consistent with the previous results. In addition fluorescence generation rate appeared to be lesser as indicated by curve slope in the presence as compared with absence of Cath G, suggesting an alteration of thrombin generation kinetics.



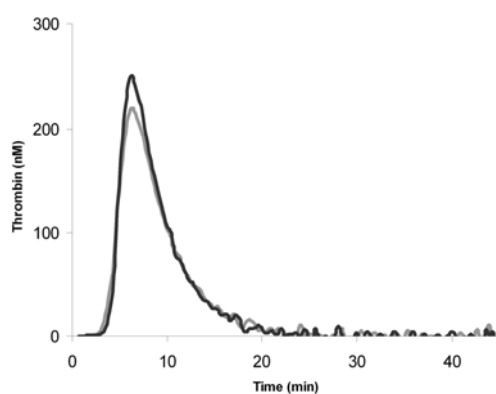
**Figure 35 : Cath G impact on thrombin generation in commercially factor XII-depleted plasma, in the presence or absence of TF triggering.**  
Black: Control; Grey: Cathepsin G



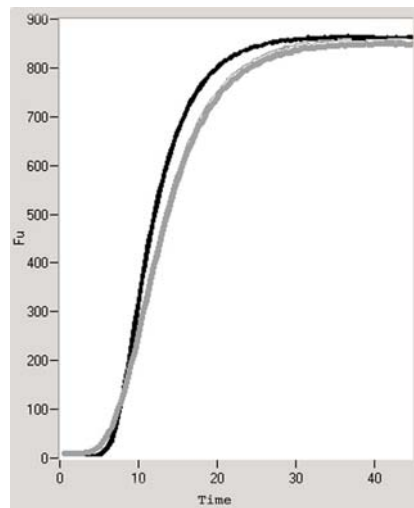
**Figure 36 : Cath G impact on thrombin generation in factor V- and factor X-depleted plasma.**  
Black: Control; Grey: Cathepsin G



**Figure 37 : Cath G impact on thrombin generation in the absence of amplification by intrinsic tenase.**  
Black: Control; Grey: Cathepsin G



**Figure 38 : Cath G impact on thrombin generation in TFPI-depleted plasma.**  
Black: Control; Grey: Cathepsin G



**Figure 39 : Antithrombin-depleted plasma: raw fluorescent data signals.**  
Black: Control; Grey: Cathepsin G

### 3) Anticoagulant activity of TFPI

To test the hypothesis of that Cath G had a detrimental effect on TFPI under our experimental conditions, the anticoagulant activity of TFPI was evaluated in the presence and absence of the granulocytic enzyme in normal plasmas. A decrease in TFPI activity in the presence of Cath G occurred in all 4 plasmas tested. Reference clotting times (no neutralizing anti-TFPI antibody) were not different whether Cath G was added or not.



## Discussion

Cathepsin G has been for a long time hypothesised to interact with haemostasis and to explain at least in part some effects of PMN. Several Cath G effects have been described on both platelets and coagulation factors, suggesting that the enzyme, when released or surface-exposed by activated PMN, could modulate thrombin generation. This could be of importance in several diseases sharing the presence in blood of activated PMN, such as sepsis (36,37) or myeloproliferative disorders (38,39). However, an overview of the complex thrombin generation process is hardly achievable by means of standard coagulation assays or even thromboelastometry. In order to get an improved appraisal of Cath G effect on coagulation, we chose Calibrated Automated Thrombography, which allows a global phenotyping of *in vitro* coagulation. To our knowledge, this method has not been previously used to address this specific issue. We studied one given concentration of Cath G, which was found in the extracellular milieu after PMN activation (25). Many non-specific protease inhibitors, which can inhibit Cath G, are present in plasma, such as  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor or  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. Nevertheless, several experimental data have shown Cath G can evade this plasmatic inhibitory activity (9) and this is confirmed by our results showing that Cath induced a consistent effect on thrombin generation profiles: accelerating the process (decreased clotting time), and impeding it at the same time since thrombin peak and ETP are reduced. Thrombin generation was triggered by a low amount TF. Under those conditions, the process is largely dependent on the amplification by Josso's Loop/intrinsic tenase (40) and may be influenced by subtle variations of any player involved in coagulation, clotting factors as well as inhibitors.

The impact of Cath G was studied with both normal and factor-depleted plasmas. A limitation in the use of commercially available plasmas relies on the impossibility to assess the thrombin generation profile before depletion. The preparation can alter other coagulation factors. To take into account this limitation, we used commercial depleted plasmas from two different manufacturers when possible; in addition each experiment was reproduced with two different batches, with similar results. In those plasmas, the levels of factors II, V, VIII, IX, X, XII, antithrombin and TFPI were measured and all found normal if not purposely depleted (data not shown). At last, in parallel with factor VIII- and factor IX-depleted plasmas, we used plasma from severe haemophilia A or B patients as well. We used neither factor VII-depleted plasma, because we did not expect any impact of Cath G since it has never been

reported to directly activate factor X, nor factor XI-depleted plasma, because the contribution of factor XI to thrombin generation assay is still controversial (24,32).

The data presented here unambiguously demonstrate that Cath G has a consistent albeit moderate impact on coagulation. Strikingly, Cath G was capable to induce both accelerating (shortened time to thrombin burst) and deleterious (decreased thrombin work and thrombin peak) effects during the same thrombin generation time-course. The combination of these two effects suggests that there is not a unique target of the enzyme in the coagulation cascade. However, effect on lag time appeared constant in each kind of plasma tested, suggesting that the procoagulant effect prevails against the anticoagulant effect. We first ruled out the hypothesis of a major action of Cath G on platelets (PAR-4-mediated platelet activation (14) or Cath G-induced disabling of PAR-1 (15)) under our experimental conditions, since the effect of Cath G remained detectable in the presence of platelet-derived membranes (activatable platelets no longer present: plasma preparation obtained after one freezing/thawing cycle of PRP). Therefore, we concluded that Cath G activity on thrombin generation, and especially on lag time, was mediated by an action on coagulation factors. There was no evidence for a direct activating cleavage of any clotting factor. Indeed, the enzyme did not induce detectable level of thrombin in the absence of both TF and FXII or when prothrombinase could not assemble (factor V- and factor X-depleted plasma). As we provided some evidence that AT was not involved in the effects of Cath G, all the results pointed to an action on TFPI. This was confirmed by the measure of the anticoagulant activity of TFPI, which was found decreased in the presence of the enzyme. Cath G-induced disabling of TFPI could explain the results of the experiments with FVIII- or FIX-deficient plasmas: the enzyme improved (but did not correct) thrombin generation, which could, in the absence of intrinsic tenase, only be attributed to TF pathway enhancement (40 - 42). Alteration of TFPI by Cath G is consistent with the literature since it has been described to cleave TFPI, particularly between K1 and K2 domains, leading to its disabling.

Concerning the anticoagulant activity of Cath G under our conditions, we only can put forward some hypotheses. Degradation of vitamin K-dependent factors, described by Turkington, can not explain it, as this was only demonstrated when calcium was absent from the experimental environment (16), contrary to our conditions. Further, the discrepancy between thrombin peak and ETP decreases led us to consider that Cath G altered the rate of thrombin conversion rather the global amount generated, since the ETP, even if diminished, remained substantial pointing to a deleterious effect on prothrombinase. Moreover an effect on FVIII was hardly conceivable, as in haemophilia A plasma, Cath G could not restore

normal thrombin generation, suggesting its anticoagulant potential was still present. One hypothesis could be that the enzyme could promote the PC/PS/TM inhibitory system. However, as TM was absent from our experimental environment, the only way would be a direct conversion of PC to APC by Cath G. This appeared very unlikely. In fact the literature only indicates the enzyme can cleave PC leading to degraded protein (16).

Factor V is critical for thrombin generation dynamics and propagation, *via* its powerful cofactor role in prothrombinase (43). Furthermore, it can be cleaved by Cath G at several sites, different from thrombin or APC sites (44). Initially these cleavages were believed to significantly activate it (20,21). However further experiments showed that Cath G-cleaved FV largely loses its cofactor activity especially under plasma conditions, and even when FV was cleaved by thrombin beforehand (44). Therefore, there are several arguments converging to factor V as the other main target of Cath G, explaining most if not all of the anticoagulant effects observed, even in TFPI-deficient plasma. Finally the absence of any statistically significant anticoagulant effect in the presence of artificial phospholipid membranes (PDP experiments) suggests that platelet environment is required for the full activity of Cath G, involving for instance platelet-derived FV associated with platelet membrane.

To conclude, the impact of Cath G on thrombin generation results in two opposite effects: acceleration of thrombin burst but decrease in generation rate. To what extent this explains for instance the association of neutrophils with thrombo-haemorrhagic complications of sepsis and myeloproliferative disorders remains to be studied. Since thrombograms in the presence of Cath G added *in vitro* do not mimic those obtained in patients with activated PMN, in sepsis (45) or myeloproliferative disorders (46) the *in vivo* effects of PMN on coagulation appear not exclusively mediated by Cath G.

## **References**

1. Esmon CT. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1343 – 8.
2. Levi M. Cross-talk between coagulation and inflammation. *Biomedical Progress.* 2003;16:8 – 14.
3. Wagner DD. New links between inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1321 – 4.
4. Goldsack NR, Chambers RC, Dabbagh K, Laurent GJ. Molecules in focus: Thrombin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30:641 – 6.
5. Krupiczkoj MA, Scotton CJ, Chambers RC. Coagulation signalling following tissue injury: focus on the role of factor Xa. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:1228 – 37.
6. Bouchard BA, Tracy PB. The participation of leukocytes in coagulant reactions. *J Thromb Haemost.* 2003;1:464 – 9.
7. Perrin J, Morlon L, Vigneron C, Marchand-Arvier M. Influence of polymorphonuclear leukocytes on the plasma clot formation as evaluated by thromboelastometry (ROTEM). *Thromb Res.* 2008;121:647 – 52.
8. Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie.* 2008;90:227 – 42.
9. Pham CT. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:1317 – 33.
10. Chignard M, Selak MA, Smith JB. Direct evidence for the existence of a neutrophil-derived platelet activator (neutrophilin). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:8609 – 13.
11. Selak MA, Chignard M, Smith JB. Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochem J.* 1988;251:293 – 9.
12. Renesto P, Chignard M. Neutrophil-mediated platelet activation: a key role for serine proteinases. *Gen Pharmacol.* 1995;26:905 – 10.
13. Cerletti C, Evangelista V, Molino M, de Gaetano G. Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb Haemost.* 1995;74:218 – 23.
14. Sambrano GR, Huang W, Faruqi T, Mahrus S, Craik C, Coughlin SR. Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J Biol Chem.* 2000;275:6819 – 23.
15. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:579 – 621.

16. Turkington PT. Cathepsin G, a regulator of human vitamin K, dependent clotting factors and inhibitors. *Thromb Res.* 1992;67:147 – 55.
17. Breznjak DV, Brower MS, Witting JI, Walz DA, Fenton JW 2nd. Human alpha- to zeta-thrombin cleavage occurs with neutrophil cathepsin G or chymotrypsin while fibrinogen clotting activity is retained. *Biochemistry.* 1990;29:3536 – 42.
18. Petersen LC, Bjørn SE, Nordfang O. Effect of leukocyte proteinases on tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 1992;67:537 – 41.
19. Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L. Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot. *Thromb Haemost.* 2007;98:359 – 67.
20. Turkington PT. Cathepsin G activates human factor V in vitro. *Thromb Res.* 1993;72:333 – 7.
21. Allen DH, Tracy PB. Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. *J Biol Chem.* 1995;270:1408 – 15.
22. Gale AJ, Rozenshteyn D. Cathepsin G, a leukocyte protease, activates coagulation factor VIII. *Thromb Haemost.* 2008;99:44 – 51.
23. Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost.* 2008;6:219 – 26.
24. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33:4 – 15.
25. Renesto P, Chignard M. Enhancement of cathepsin G-induced platelet activation by leukocyte elastase: consequence for the neutrophil-mediated platelet activation. *Blood.* 1993;82:139 – 44.
26. Regnault V, Béguin S, Lecompte T. Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33:23 – 9.
27. Hézard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Nguyen P. Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clin Chem.* 2006;52:665 – 70.
28. Trossaërt M, Regnault V, Sigaud M, Boisseau P, Fressinaud E, Lecompte T. Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. *J Thromb Haemost.* 2008;6:486 – 93.

29. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res.* 2004;114:539 – 45.
30. Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, Hemker HC, Negrier C. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost.* 2005;93:475 – 80.
31. van Hylckama Vlieg A, Christiansen SC, Luddington R, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Baglin TP. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *Br J Haematol.* 2007;138:769 – 74.
32. Ghosh K, Mota L, Shetty S, Kulkarni B. Spectrum of changes in endogenous thrombin potential due to heritable disorders of coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008;19:577 – 80.
33. Al Dieri R, Peyvandi F, Santagostino E, Giansily M, Mannucci PM, Schved JF, Béguin S, Hemker HC. The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding. *Thromb Haemost.* 2002;88:576 – 82.
34. Duchemin J, Pan-Petes B, Arnaud B, Blouch MT, Abgrall JF. Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Haemost.* 2008;99:767 – 73.
35. Dahm AE, Andersen TO, Rosendaal F, Sandset PM. A novel anticoagulant activity assay of tissue factor pathway inhibitor I (TFPI). *J Thromb Haemost.* 2005;3:651 – 8.
36. Fourrier F, Jourdain M, Tournois A, Caron C, Goudemand J, Chopin C. Coagulation inhibitor substitution during sepsis. *Intensive Care Med.* 1995;21:S264 – 8.
37. Gando S, Kameue T, Matsuda N, Hayakawa M, Hoshino H, Kato H. Serial changes in neutrophil-endothelial activation markers during the course of sepsis associated with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 2005;116:91 – 100.
38. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, Manarini S, Finazzi G, Cerletti C, Barbui T. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 2000;96:4261 – 6.
39. Marchetti M, Falanga A. Leukocytosis, JAK2V617F mutation, and hemostasis in myeloproliferative disorders. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2008;36:148 – 59.
40. Xi M, Béguin S, Hemker HC. Importance of factor-IX-dependent prothrombinase formation--the Jossen pathway--in clotting plasma. *Haemostasis.* 1989;19:301 – 8.

41. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* 2003;17:S1 – 5.
42. Mann KG. Thrombin formation. *Chest.* 2003;124:4S – 10S.
43. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood.* 2003;101:20 – 30.
44. Camire RM, Kalafatis M, Tracy PB. Proteolysis of factor V by cathepsin G and elastase indicates that cleavage at Arg1545 optimizes cofactor function by facilitating factor Xa binding. *Biochemistry.* 1998;37:11896 – 906.
45. Collins PW, Macchiavello LI, Lewis SJ, Macartney NJ, Saayman AG, Luddington R, Baglin T, Findlay GP. Global tests of haemostasis in critically ill patients with severe sepsis syndrome compared to controls. *Br J Haematol.* 2006;135:220 – 7.
46. Marchetti M, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Balducci D, Barbui T, Rosing J, Ten Cate H, Falanga A. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 2008;112:406 – 18.

### **C.III.2.3 Effects of human neutrophil elastase on in vitro thrombin generation**

#### **Summary**

Human neutrophil elastase (HNE), a serine-protease mostly found in the azurophilic granules of neutrophils, is supposed to modulate haemostasis for many years. The enzyme can impair the clot formation by fibrin(ogen) degradation but can also accelerate the process by inactivation of inhibitors. In addition, HNE can degrade many other clotting factors, such as FVII or FIX. Thrombin generation (CAT method) was chosen to study its overall effect on coagulation, at a plasma concentration (380 nM) corresponding to that measured after neutrophil activation. Coagulation was triggered by a low concentration of tissue factor in the presence or absence of platelets. To further help identify a potential main target of HNE, coagulation factor-depleted plasmas were used. Results in PRP show that HNE induces a hypercoagulable phenotype on thrombin generation profile, by reducing the clotting time, in association with increase in both thrombin peak and ETP. Our data indicate that coagulation acceleration can not be attributed to platelet activation under our experimental conditions. The use of selective coagulation factor-depleted plasmas led us to conclude that the procoagulant effect of HNE, in accordance with literature, is due to the reduction of the anticoagulant activity of both TFPI and antithrombin. Degradation of other factors appears not significant.

**Keywords:** Human neutrophil elastase, thrombin generation test, CAT, TFPI, Antithrombin

#### **Introduction**

Human neutrophil elastase (HNE; EC 3.4.21.37) is a 30kDa glycoprotein mostly found in the azurophilic granules of polymorphonuclear leukocytes (PMN). Upon appropriate stimulation, HNE can be also localized on the cell membrane or released in the extracellular matrix. Apart from its major role in host defense, HNE proteasic activity supports many other biological functions, such as modulation of cytokine signalling [Pham, 2008]. In addition HNE is for long time known to interact with haemostasis [Rulot, 1904]. By its plasminogen-independent activity, it is considered as a major actor in fibrinolysis [Plow, 1980; Plow, 1982]. In fact, many reports indicate that HNE can act directly on fibrin(ogen) and the related products generated are immunologically different from those derived from plasmin [Gramse, 1978; Bach-Gansmo, 1994]. Thus, HNE facilitates clot lysis. However the enzyme is also clearly involved in thrombohaemorrhagic complications of multiple organ failure or sepsis, by



degradation of coagulation inhibitors, TFPI (Higuchi, 1992; Petersen, 1992) and AT (Jochum, 1981) but also many clotting factors: human alpha-thrombin (Brower, 1987), factors VII (Anderssen, 1993), VIII (Varadi, 1980; Kopec, 1980), IX (Takaki, 1983; Samis, 1998) and X (Turkington, 1991). On the opposite HNE may be also capable of activating factor V but can disable thrombin-activated factor V (Oates & Salem, 1987; Samis, 1997). Further, in a model of experimental sepsis, increasing plasma HNE levels have been shown to be associated with rapid decrease in level of several coagulation factors (such fibrinogen, FII, FVII or FX), although a direct degradation of these factors by HNE is not demonstrated (Samis, 2009). All these data indicate that HNE could modulate thrombin generation but degradation of both coagulation factors and inhibitors makes difficult the appreciation of the net result of HNE. As only few coagulation assays give an overview of the process, action of HNE on thrombin generation process has never been clearly reported.

For several years, the study of *in vitro* thrombin generation has been much improved (Hemker, 2007) to allow 1) quasi continuous *in situ* measurement of thrombin work during time; 2) study without defibrination steps; and most importantly 3) study with platelets or leucocytes, by using a fluorogenic substrate. The CAT method (Calibrated Automated Thrombogram) uses a fluorogenic substrate and an appropriate treatment of the fluorescent signal in order to get the whole thrombin course in adequately stimulated plasma Thrombogram) (Hemker, 2003). Given that over 95% of thrombin work is generated after plasma clotting, this assay can provide an overview of the coagulation process in the presence of blood cells.

The present study aimed to evaluate the overall impact of HNE on thrombin generation. Thus, plasmas (with or without platelets) from healthy volunteers were spiked with a fixed concentration of HNE corresponding to the one measured after PMN activation and degranulation (Renesto, 1993). In order to get further insight in a potential main target of HNE, plasmas selectively depleted in clotting factors or inhibitors were used.

### **Materials and methods; Statistical analysis**

Identical with Cath G experiments, except that HNE concentration was 380 nM.

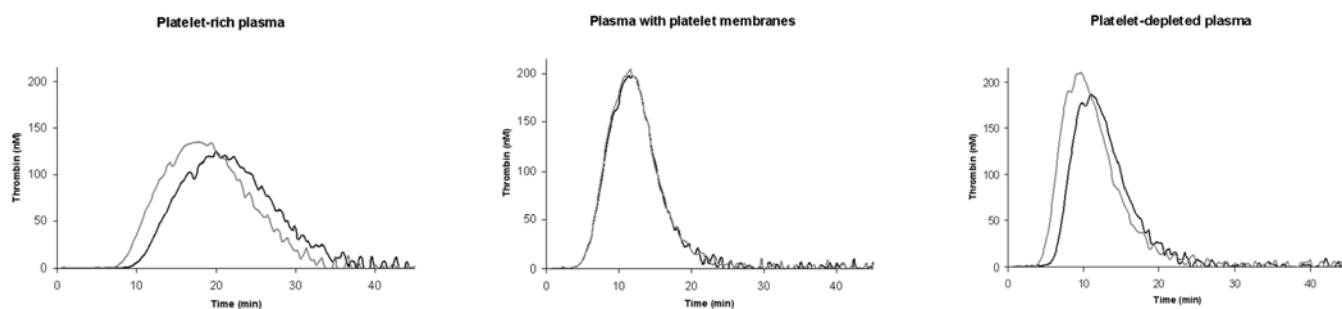
## Results

### 1) Influence of HNE on thrombin generation in plasma from healthy volunteers

Spiking of PRP (N=10) with HNE led to significant modifications of thrombin generation profiles, as shown in Figure 40 and Table 16a. The enzyme induced indeed a significant decrease in lag time associated with the increase in both ETP and thrombin peak. As a result, the presence of HNE induced a significant hypercoagulable phenotype. Surprisingly no effect was observed in PPM (N=9) (Figure 40 and Table 16b). This may suggest that HNE action occurs when platelets are functional, or that HNE is disabled/ineffective under this experimental condition. By contrast, in PDP (N=10), HNE induced modifications of thrombin generation profiles close to that obtained with PRP (Figure 40). Nevertheless, the only statistically significant effect was a decrease in lag time before explosive thrombin generation (Table 16c). Thrombin peak and ETP tended to be increased, although not significantly. Taken together, these results indicated a procoagulant activity similar to that obtained in PRP.

**Tableau 16 : Effects of HNE on thrombograms parameters in normal plasmas (PRP, PPM and PDP).**  
Results are presented as mean  $\pm$  SD.

|                       |                | HNE -            | HNE +            | p             |
|-----------------------|----------------|------------------|------------------|---------------|
| <b>a. PRP</b><br>N=10 | ETP (nM.min)   | 1540 $\pm$ 357   | 1699 $\pm$ 383   | <b>0.0077</b> |
|                       | Lag Time (min) | 11.68 $\pm$ 1.40 | 10.41 $\pm$ 1.40 | <b>0.0051</b> |
|                       | Peak (nM)      | 98 $\pm$ 22      | 113 $\pm$ 22     | <b>0.0051</b> |
| <b>b. PPM</b><br>N=9  | ETP (nM.min)   | 1665 $\pm$ 373   | 1677 $\pm$ 395   | 0.5147        |
|                       | Lag Time (min) | 6.02 $\pm$ 0.52  | 5.97 $\pm$ 0.49  | 0.4982        |
|                       | Peak (nM)      | 200 $\pm$ 41     | 187 $\pm$ 46     | 0.1386        |
| <b>c. PDP</b><br>N=10 | ETP (nM.min)   | 1448 $\pm$ 279   | 1510 $\pm$ 389   | 0.2845        |
|                       | Lag Time (min) | 5.55 $\pm$ 1.65  | 4.56 $\pm$ 1.15  | <b>0.0077</b> |
|                       | Peak (nM)      | 174 $\pm$ 67     | 197 $\pm$ 80     | 0.1688        |



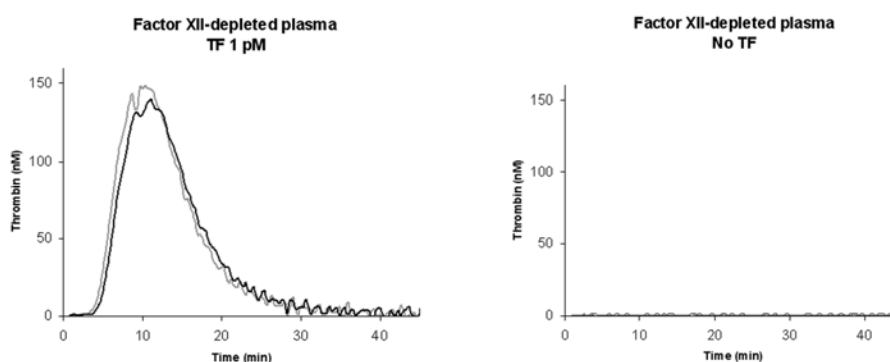
**Figure 40 : Typical impact of HNE on thrombin generation in normal plasmas.**  
Black: Control; Grey: HNE

## 2) Influence of HNE on thrombin generation in human coagulation factor-depleted plasmas

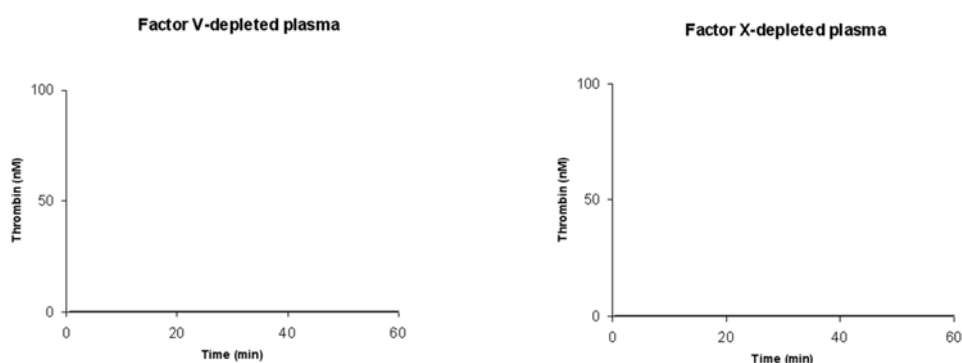
In factor XII-depleted plasma, when thrombin generation was triggered by TF 1 pM (Figure 41), HNE induced modifications in the profile, which appeared very close to that obtained with plasmas from healthy donors (PRP and PDP): decrease in lag time, slight increase in both ETP and peak. This allowed us to conclude that the results obtained here were not due to untimely HNE-induced contact pathway activation. Moreover, in the absence of added TF, no thrombin generation at all could be detected, indicating the enzyme cannot trigger by itself the coagulation process, by direct activation of one or several of the zymogens downstream the contact phase and TF. Furthermore, experiments with factor V- or factor X-depleted plasmas led to conclude that HNE was able to by-pass prothrombinase and to directly convert prothrombin to thrombin to reach a detectable level (Figure 42).

In order to gain further insight into the mechanism of HNE-induced acceleration of the thrombin burst, we have also used plasmas deficient in anti-haemophilic factors, either artificially depleted or prepared from patients with severe haemophilia A or B. Indeed at low TF concentration, explosive thrombin generation depends, at least in part, on factor Xa production by intrinsic tenase (Factor VIIIa/Factor IXa) assembled on phospholipid surfaces as can be seen from the tracings shown in figure 43. In the absence of factor VIII or IX, HNE induced a decrease in lag time and facilitated the explosive formation of thrombin (Figure 43). Thrombin peak did not reach normal levels however (174 nM in normal PDP – table 16), showing that the enzyme could not fully restore normal thrombin generation. We next addressed by using the same approach the role of changes in physiologic inhibitors. In TFPI-depleted plasma, the above-mentioned effects of Cath G were no longer evidenced: effects on

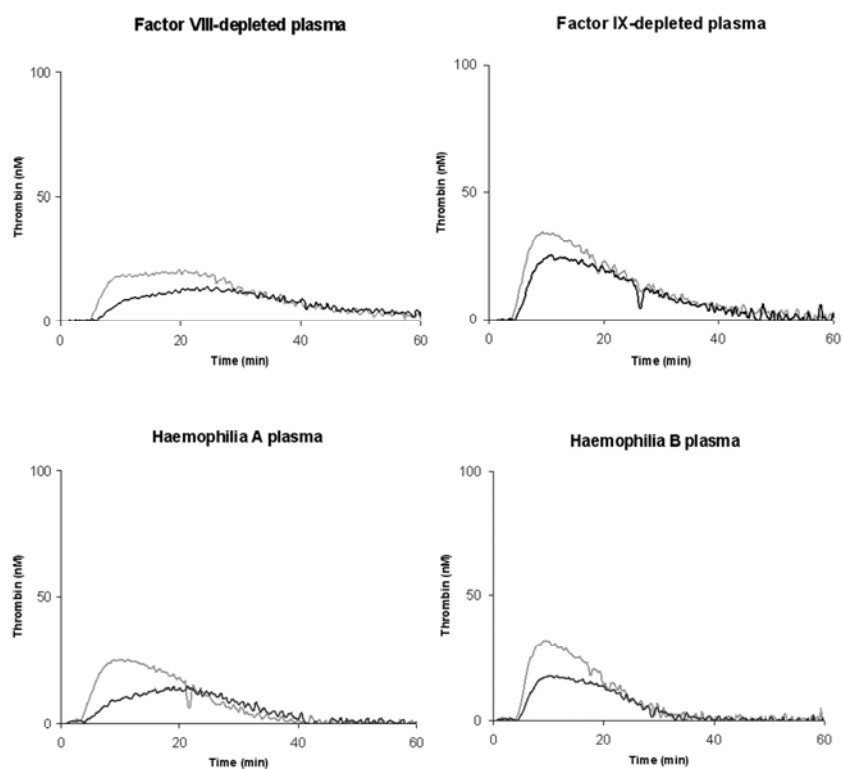
lag time disappeared, peak and ETP tended to be higher (Figure 44). No thrombogram from AT-deficient plasma experiments could be obtained. Indeed, because of AT absence, thrombin levels were so high (higher than the fluorescence signal in the calibrator well) that complete substrate consumption occurred, thus preventing fluorescence signal conversion to thrombin concentration by the Thrombinoscope® software. However, visual inspection of raw fluorescent data remained possible (Figure 45): it appeared that signal obtained with HNE was almost completely superimposed with that in its absence. This allowed us to conclude that HNE did not modify thrombin generation kinetics at all in the absence of AT. Taken together, these data indicate the presence of both TFPI and AT is required for the procoagulant activity of HNE.



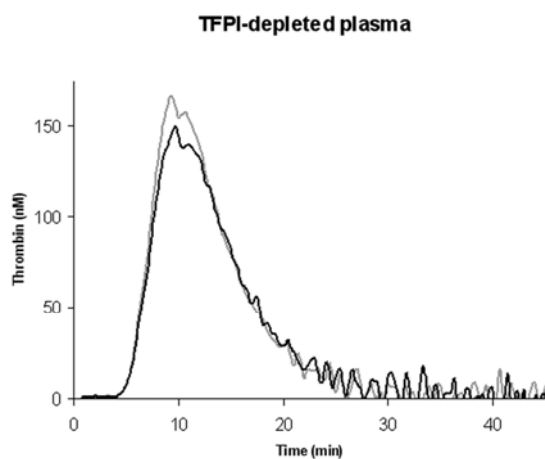
**Figure 41 : HNE impact on thrombin generation in commercially factor XII-depleted plasma, in the presence or absence of TF triggering.**  
Black: Control; Grey: HNE



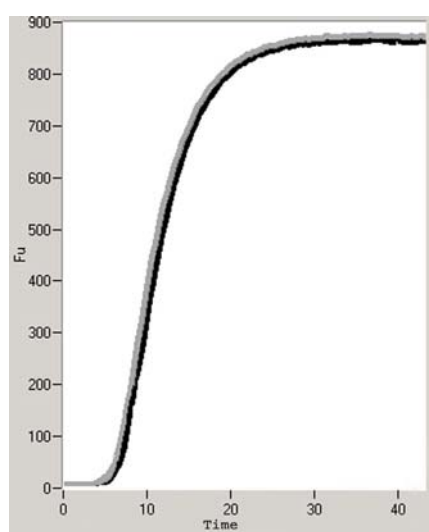
**Figure 42 : HNE impact on thrombin generation in commercially, factor V- and factor X-depleted plasma.**  
Black: Control; Grey: HNE



**Figure 43 : HNE impact on thrombin generation in the absence of amplification by intrinsic tenase.**  
Black: Control; Grey: HNE



**Figure 44 : HNE impact on thrombin generation in TFPI-depleted plasma.**  
Black: Control; Grey: HNE



**Figure 45 : Antithrombin-depleted plasma: raw fluorescent data signals.**  
Black: Control; Grey: HNE

## Discussion

Human Neutrophil Elastase has been for long time supposed to interact with haemostasis and to explain at least in part some effects of PMN. Many HNE effects are described on coagulation factors especially, suggesting, when released or surface-exposed by activated PMN, the enzyme could modulate *in vivo* thrombin generation. This is of importance in several pathological situations, where coagulation and inflammatory process are activated, such as sepsis, where the role of the enzyme in the disseminated intravascular coagulation associated is widely accepted [Fourrier, 1995]. However, an overview of the complex thrombin generation process is hardly achievable by means of standard coagulation assays. In order to have an improved assessment of the enzyme effect on coagulation, we have chosen Calibrated Automated Thrombography®, which allows a global phenotyping of coagulation. To our knowledge, this is the first time this method is used to address this specific issue. We studied one given concentration of HNE, which was found in the extracellular milieu after PMN activation (Renesto, 1993). Thrombin generation was triggered by a low amount TF. Indeed, under those conditions, the process is largely dependent on amplification by Josso's Loop/intrinsic tenase (Xi, 1989) and may be influenced by subtle variations of any coagulation factor involved, procoagulants as well as inhibitors. Data presented here unambiguously demonstrate that HNE has an impact on coagulation. The impact of the enzyme was studied on both normal and coagulation factor-depleted plasmas. A limitation in the use of commercially available plasmas relies on the impossibility to assess the thrombin generation profile before depletion. The preparation procedure can alter other coagulation factors. To take into account this limitation, we used commercial depleted plasmas from two different manufacturers when possible; in addition each experiment was reproduced with two different batches, with similar results. In those plasmas, levels of factors II, V, VIII, IX, X, XII, antithrombin and TFPI was measured and all found normal if not purposely depleted (data not shown). At last, in parallel with commercial factor VIII- and factor IX-depleted plasma, we used plasma from severe haemophilia A or B patients as well. We did not use in our experiments neither factor VII-depleted plasma, because we did not expect any impact of HNE since it has never been reported to directly activate factor X, nor factor XI-depleted plasma, because the contribution of factor XI in thrombin generation assay is still controversial (Hemker, 2003; Gosh, 2008).

In a primary approach, we studied the effect of HNE-spiking on normal plasmas from healthy volunteers. HNE conferred an almost constant procoagulant tendency by decreasing lag time in association with the increase in thrombin peak and ETP. However, this procoagulant phenotype - observed in PRP and to a lesser extent in PDP - completely disappeared when study was performed in PPM. This was quite unexpected, and several hypotheses can be formulated: first, this may suggest that the effect of the enzyme is mediated by modulation of platelet functionality and further activation. However, it appears unlikely since, even though several effect of HNE on platelets are reported [Brower, 1985; Si-Tahar, 1997], a direct activation – as for example Cath G, another serine-protease from PMN, can induce [Selak, 1988] – has never been clearly demonstrated. In addition, the procoagulant effect was still observed in PDP. The second hypothesis would be that the enzyme loses its activity when added to PPM: many non-specific protease inhibitors are present in plasma (as for example,  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor or Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor – SLPI). Several experimental data show HNE can evade this plasmatic inhibitory activity (Pham, 2008) and our results in PRP and PDP confirmed it as HNE-spiking systematically induced a reproducible effect on thrombin generation profiles. Nevertheless, SLPI has been reported to be present in murine platelets [Schulze, 2004], and this inhibitor has a high affinity to HNE [Thompson & Ohlsson, 1986; Sallenave, 2000]. In PPM, platelets are not functional any longer, procoagulant phospholipids are exposed and cellular content has been at least in part released. After the freezing/thawing cycle, SLPI may have been released into plasma, explaining the lack of effect of HNE in PPM.

All these results led us to conclude that HNE impact is mediated by action on coagulation factors rather than platelet functionality.

First experiments were conducted with factor XII-depleted plasma. When triggering coagulation with TF 1 pM, data can be considered as a control since we did not expect any pro-activating effects of HNE on contact phase, given that it has rather been shown to inactivate key components of the system (Yarovaya, 2002). In fact, our results confirmed the hypothesis as HNE impact in factor XII-depleted plasma is similar to that obtained with normal plasmas. More interestingly, in factor XII-depleted plasma, in the only presence of phospholipids (no TF), HNE did not induce detectable levels of thrombin. This result indicated that the enzyme can directly activate neither factor X nor prothrombin. Absence of direct conversion of prothrombin to thrombin was confirmed by experiments with factor X- or factor V-depleted plasmas. Thus consistently with literature, there were no evidence for a direct activating cleavage of any clotting factor by HNE. Rather, HNE procoagulant activity



appeared to be mediated by action of coagulation inhibitors, TFPI and AT under our conditions. In fact, when TFPI was absent, no effect of Cath G on lag time could be observed. When AT was absent, fluorescence signals were completely superimposed with or without the enzyme. This was confirmed by experiments in FVIII- or FIX-deficient plasmas, since the enzyme appeared to restore a significant (even if not normal) thrombin generation in association with a decrease in lag time, which only can be attributed to factor Xa half-life enhancing through action on inhibitors. This is in accordance with the literature, where action of HNE on AT is well-described and leads to the inactivation of the inhibitor by a single and specific cleavage in the peptide loop containing the reactive center [Jochum, 1981; Carrell & Owen, 1985; Jordan, 1989]. Concerning TPFI, HNE-mediated loss of activity has been also reported in the literature, as the enzyme can cleave TFPI between K1 and K2 domains [Higuchi, 1992]. Thus, the procoagulant effect induced by HNE in normal plasmas was related to alteration of thrombin generation inhibition. Moreover a simultaneous degradation of other critical coagulation factors such as FVII [Anderssen, 1993], or FIX [Takaki, 1983], reported in the literature, appears very unlikely since even in the absence of either TFPI or AT, no hypocoagulable phenotype was observed.

To conclude, thrombin generation test allowed us to study the global impact of HNE on coagulation and revealed the enzyme induced a hypercoagulable phenotype by action on both TFPI and AT, which could explain disseminated intravascular coagulation associated with exaggerated inflammation states. However, profiles obtained here with HNE alone do not mimic those reported in patients with activated-PMN, in sepsis [Collins, 2006] or myeloproliferative syndromes [Marchetti, 2008]; this suggests that the *in vivo* effects of PMN on coagulation are not exclusively mediated by HNE.

## **References**

- Al Dieri R, Peyvandi F, Santagostino E, Giansily M, Mannucci PM, Schved JF, Béguin S, Hemker HC. The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding. *Thromb Haemost.* 2002;88:576 – 82.
- Anderssen T, Halvorsen H, Bajaj SP, Osterud B. Human leukocyte elastase and cathepsin G inactivate factor VII by limited proteolysis. *Thromb Haemost.* 1993;70:414-7.
- Bach-Gansmo ET, Halvorsen S, Godal HC, Skjønberg OH. Impaired coagulation of fibrinogen due to digestion of the C-terminal end of the A alpha-chain by human neutrophil elastase. *Thromb Res.* 1994;73:61-8.
- Brower MS, Levin RI, Garry K. Human neutrophil elastase modulates platelet function by limited proteolysis of membrane glycoproteins. *J Clin Invest.* 1985 Feb;75(2):657-66.
- Brower MS, Walz DA, Garry KE, Fenton JW 2nd. Human neutrophil elastase alters human alpha-thrombin function: limited proteolysis near the gamma-cleavage site results in decreased fibrinogen clotting and platelet-stimulatory activity. *Blood.* 1987;69:813-9.
- Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67:3 –12.
- Carrell RW, Owen MC. Plakalbumin, alpha 1-antitrypsin, antithrombin and the mechanism of inflammatory thrombosis. *Nature.* 1985 Oct 24-30;317(6039):730-2.
- Collins PW, Macchiavello LI, Lewis SJ, Macartney NJ, Saayman AG, Luddington R, Baglin T, Findlay GP. Global tests of haemostasis in critically ill patients with severe sepsis syndrome compared to controls. *Br J Haematol.* 2006;135:220 – 7.
- Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, Hemker HC, Negrier C. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost.* 2005;93:475 – 80.

- Dielis AW, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Hamulyák K, Ten Cate H, Rosing J. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J Thromb Haemost.* 2008 J;6:125 – 31.
- Duchemin J, Pan-Petes B, Arnaud B, Blouch MT, Abgrall JF. Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Haemost.* 2008;99:767 – 73.
- Fourrier F, Jourdain M, Tournois A, Caron C, Goudemand J, Chopin C. Coagulation inhibitor substitution during sepsis. *Intensive Care Med.* 1995;21:S264-8.
- Ghosh K, Mota L, Shetty S, Kulkarni B. Spectrum of changes in endogenous thrombin potential due to heritable disorders of coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008;19:577 – 80.
- Gramse M, Bingenheimer C, Schmidt W, Egbring R, Havemann K. Degradation products of fibrinogen by elastase-like neutral protease from human granulocytes. Characterization and effects on blood coagulation in vitro. *J Clin Invest.* 1978;61:1027-33.
- Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33:4 –15.
- Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost.* 2008;6:219 – 26.
- Hézard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Nguyen P. Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clin Chem.* 2006;52:665 – 70.
- Higuchi DA, Wun TC, Likert KM, Broze GJ Jr. The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood.* 1992;79:1712-9.
- Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* 2003;17:S1 – 5.

- Jochum M, Lander S, Heimburger N, Fritz H. Effect of human granulocytic elastase on isolated human antithrombin III. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1981;362:103-12.
  
- Jordan RE, Nelson RM, Kilpatrick J, Newgren JO, Esmon PC, Fournel MA. Inactivation of human antithrombin by neutrophil elastase. Kinetics of the heparin-dependent reaction. *J Biol Chem.* 1989;264:10493-500.
  
- Keularts IM, Zivelin A, Seligsohn U, Hemker HC, Béguin S. The role of factor XI in thrombin generation induced by low concentrations of tissue factor. *Thromb Haemost.* 2001 Jun;85(6):1060-5.
  
- Kopeć M, Bykowska K, Lopaciuk S, Jelenska M, Kaczanowska J, Sopata I, Wojtecka E. Effects of neutral proteases from human leukocytes on structure and biological properties of human factor VIII. *Thromb Haemost.* 1980;43:211-7.
  
- Marchetti M, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Balducci D, Barbui T, Rosing J, Ten Cate H, Falanga A. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 2008;112:406 – 18.
  
- Pham CT. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:1317-33.
  
- Plow EF. Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway. *J Clin Invest.* 1982;69:564-72.
  
- Plow EF. The major fibrinolytic proteases of human leukocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1980;630:47-56.
  
- Regnault V, Béguin S, Lecompte T. Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33:23 – 9.

- Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res.* 2004;114:539 – 45.
- Renesto P, Chignard M. Enhancement of cathepsin G-induced platelet activation by leukocyte elastase: consequence for the neutrophil-mediated platelet activation. *Blood.* 1993;82:139 – 44.
- Rulot H. Intervention des leucocytes dans l'autolyse de la fibrine. *Arch Int Physiol Biochim.* 1904;1:152-8.
- Sallenave JM. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteases in inflammatory lung disease. *Respir Res.* 2000;1(2):87-92.
- Samis JA, Garrett M, Manuel RP, Nesheim ME, Giles AR. Human neutrophil elastase activates human factor V but inactivates thrombin-activated human factor V. *Blood.* 1997;90:1065-74.
- Samis JA, Kam E, Nesheim ME, Giles AR. Neutrophil elastase cleavage of human factor IX generates an activated factor IX-like product devoid of coagulant function. *Blood.* 1998;92:1287-96.
- Samis JA, Stewart KA, Nesheim ME, Taylor FB Jr. Time-dependent association between coagulation factor inactivation and increased elastase during experimental sepsis. *J Thromb Haemost.* 2009 Jun;7(6):1032-4.
- Schulze H, Korpai M, Bergmeier W, Italiano JE Jr, Wahl SM, Shivdasani RA. Interactions between the megakaryocyte/platelet-specific beta1 tubulin and the secretory leukocyte protease inhibitor SLPI suggest a role for regulated proteolysis in platelet functions. *Blood.* 2004 Dec 15;104(13):3949-57.
- Selak MA, Chignard M, Smith JB. Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochem J.* 1988;251:293 – 9.

- Si-Tahar M, Pidard D, Balloy V, Moniatte M, Kieffer N, Van Dorsselaer A, Chignard M. Human neutrophil elastase proteolytically activates the platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 through cleavage of the carboxyl terminus of the  $\alpha$ IIb subunit heavy chain. Involvement in the potentiation of platelet aggregation. *J Biol Chem.* 1997;272:11636-47.
- Takaki A, Enfield DL, Thompson AR. Cleavage and inactivation of Factor IX by granulocyte elastase. *J Clin Invest.* 1983;72:1706-15.
- Thompson RC, Ohlsson K Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Sep;83(18):6692-6.
- Trossaert M, Regnault V, Sigaud M, Boisseau P, Fressinaud E, Lecompte T. Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. *J Thromb Haemost.* 2008;6:486 – 93.
- Turkington PT. Degradation of human factor X by human polymorphonuclear leucocyte cathepsin G and elastase. *Haemostasis.* 1991;21:111-6.
- van Hylckama Vlieg A, Christiansen SC, Luddington R, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Baglin TP. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *Br J Haematol.* 2007;138:769 – 74.
- Váradi K, Marossy K, Asbóth G, Elödi P, Elödi S. Inactivation of human Factor VIII by granulocyte proteases. *Thromb Haemost.* 1980;43:45-8.
- Xi M, Béguin S, Hemker HC. Importance of factor-IX-dependent prothrombinase formation--the Josso pathway--in clotting plasma. *Haemostasis.* 1989;19:301 – 8.
- Yarovaya GA, Blokhina TB, Neshkova EA. Contact system. New concepts on activation mechanisms and bioregulatory functions. *Biochemistry (Mosc).* 2002;67:13-24.

### C.III.2.4 Mesure de l'activité anticoagulante du TFPI plasmatique

D'après Dahm AE, Andersen TO, Rosendaal F, Sandset PM. A novel anticoagulant activity assay of tissue factor pathway inhibitor I (TFPI). *J Thromb Haemost.* 2005;3:651-8.

#### C.III.2.41 Matériel et réactifs

- ☒ **Tampon TBS** : TRIS HCl 0,05 M ; NaCl 0,15 M ; ajusté à pH 7,4
- ☒ **Tampon calcique** : CaCl<sub>2</sub> dans TBS (concentration finale 35 mM)
- ☒ **Facteur tissulaire humain recombinant** (Innovin®, Dade Berhing) : à diluer au 1/600 dans TBS
- ☒ **Rabbit anti-human TFPI IgG N°4901** (American Diagnostica): à diluer au ¼ dans tampon TBS
- ☒ **Cathepsine G granulocytaire humaine lyophilisée** (Sigma). Flacon conservé à -80°C. Avant utilisation, décongélation 10 min à température ambiante et reconstitution dans de l'eau ultra-filtrée, afin d'obtenir une solution mère titrée à 3730 nM.
- ☒ **Elastase granulocytaire humaine lyophilisée** (Sigma). Flacon conservé à -80°C. Avant utilisation, décongélation 10 min à température ambiante et reconstitution dans de l'eau ultra-filtrée, afin d'obtenir une solution mère titrée à 6100 nM.
- ☒ **Plasma pauvre en plaquettes** issu de sang total citraté
- ☒ **Coagulomètre KC10** (Amelung)

#### C.III.2.42 Protocole expérimental

- 1- incuber 60 µL PPP + 4 µL enzyme granulocytaire (concentration finale Cath G 240 nM ; HNE 380 nM) ou eau ultrafiltrée à 37°C pendant 10 min
- 2- ajouter 16 µL de TBS ou d'Ig anti-TFPI et incuber à 37°C pendant 5 min
- 3- ajouter 60 µL de facteur tissulaire dilué et incuber à 37°C pendant 1 min
- 4- ajouter 60 µL de tampon calcique et déclencher le chronomètre
- 5- mesurer le temps de formation du caillot
- 6- 'activité TFPI est mesurée en calculant le rapport :  
Temps de coagulation SANS anticorps anti-TFPI / Temps de coagulation AVEC anticorps anti-TFPI.

Nb : L'erreur expérimentale (CV) est de 3 %

### C.III.2.43 Résultats (N=4) et conclusion

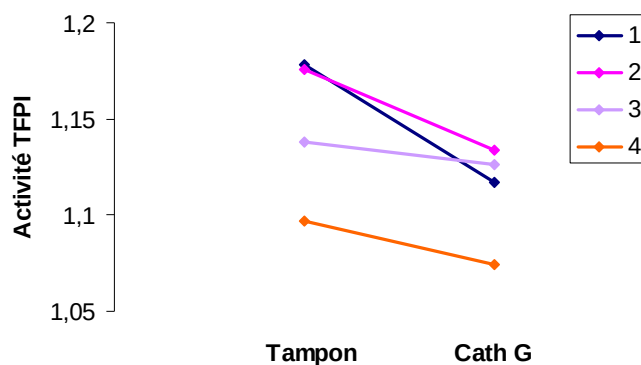


Figure 46 : Effet de la Cathepsine G sur l'activité du TFPI plasmatique (N=4)

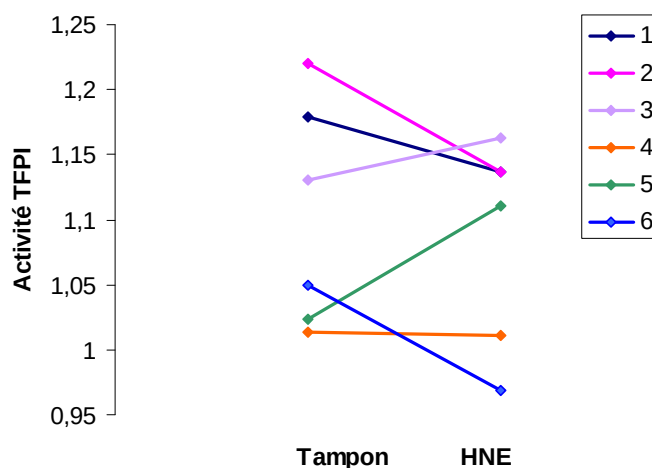


Figure 47 : Effet de l'élastase sur l'activité du TFPI plasmatique (N=4)

L'activité anticoagulante du TFPI mesurée a systématiquement diminuée en présence de Cath G 240 nM, ce qui constitue un argument fort en faveur d'une dégradation du TFPI par l'enzyme dans nos conditions expérimentales.

Les résultats sont moins nets en ce qui concerne l'HNE 380 nM, même si pour 3 sujets, l'activité anticoagulante du TFPI a fortement diminuée.

L'augmentation de l'activité anticoagulante du TFPI en présence d'HNE est aberrante et pourrait s'expliquer par une interférence de celle-ci avec l'Ac anti-TFPI utilisé (dégradation ?).





## MEMO

*Les 2 sérine-protéases granulocytaires, Cathepsine G et élastase, lorsqu'elles sont présentes dans le plasma à concentrations proches de celles mesurées après libération par les PN activés, modifient significativement la génération de thrombine. Chacune des 2 enzymes possède un effet qui lui est propre, mais toutes 2 sont capables de diminuer le temps de coagulation. L'HNE induit un profil hypercoagulable alors que la Cath G induit un phénotype double hyper- et hypocoagulable. Un effet sur la fonctionnalité plaquettaire est peu probable. Le TFPI apparaît comme une cible majeure, commune aux 2 enzymes ; l'activité de l'HNE passe également par une inactivation de l'AT alors que l'altération de la cinétique du processus en présence de Cath G est attribuable à une dégradation du facteur V.*



### C.III.3- Conclusion

L'analyse bibliographique a souligné l'ambiguïté de l'impact des 2 enzymes granulocytaires, Cath G et HNE, dans l'Hémostase et plus particulièrement la coagulation. Elles sont en effet toutes deux capables d'agir à la fois sur des facteurs procoagulants et des inhibiteurs ce qui rend difficile la prédiction de leur effet global sur le processus.

Afin de tenter de clarifier cette vision, nous avons choisi de travailler à concentration unique et fixe, judicieusement choisie en fonction des données de la littérature, pour chacune des 2 enzymes et d'utiliser des systèmes globaux d'étude de la coagulation.

Tout d'abord, si la Cath G et l'HNE sont bel et bien capables d'influencer le processus, nos données illustrent l'ambiguïté sus-citée. Dans les 2 systèmes d'étude choisis, ROTEM® et CAT®, des effets à la fois pro- et anticoagulants, ont pu être relevés en présence de l'une comme l'autre des enzymes, suggérant un effet complexe et probablement « multi-cibles ».

Néanmoins, nos données permettent de dégager des points d'impact au retentissement plus significatif que d'autres.

Concernant la Cath G, nos résultats montrent que celle-ci a bien une activité procoagulante, mais qui dans nos conditions, apparaît nettement comme indépendante d'un effet sur la fonctionnalité plaquettaire, pourtant très détaillé et cité dans la littérature. Il semble clair que la capacité à diminuer les temps de coagulation (en ROTEM® comme en CAT®) soit lié à une perte de l'activité anticoagulante du TFPI. Toutefois, la Cath G fait état d'une activité complexe car, à nouveau dans les 2 systèmes d'étude, celle-ci induit une altération de la cinétique du processus, après le changement de phase du plasma. Une action sur le facteur V est la plus plausible pour l'expliquer.

Concernant l'HNE, elle fait également preuve d'une activité double, procoagulante et délétère à la fois, mais contrairement à la Cath G, cela ne s'exprime pas dans les 2 systèmes. L'action délétère est attribuable à une dégradation de la (du) fibrin(ogène), et qui est probablement de retentissement *in vivo* modéré, car uniquement observé en ROTEM® en l'absence de plaquettes. De façon attendue, le retentissement d'un tel effet en CAT® est faible, ce qui est cohérent avec l'absence d'observations de tout effet délétère notable dans ce système. Toutefois il pourrait contrebalancer l'effet procoagulant noté, ce qui pourrait expliquer que celui-ci soit relativement modéré alors qu'il est lié à l'inactivation (même

patielle) de 2 systèmes majeurs d'inhibition de la coagulation, TFPI et AT. Aussi nos données permettent d'écarter l'hypothèse d'une dégradation de plusieurs facteurs procoagulants, comme suggéré dans la littérature pour expliquer les désordres de la coagulation associés à un contexte de sepsis par exemple.

## **C.IV. Une application en Recherche clinique :**

**« Evaluation de la contribution des polynucléaires dans la thrombogenèse au cours des syndromes myéloprolifératifs JAK2<sup>V617F</sup> positif »**

## C.IV.1- Objectifs / hypothèses de travail

L'analyse bibliographique présentée dans la partie A.IV.6 montre que les travaux, tant fondamentaux qu'épidémiologiques, tendent à attribuer aux leucocytes, et plus particulièrement aux polynucléaires, un rôle important dans la thrombogenèse chez les patients atteints de Thrombocytémie Essentielle (TE) ou de Polyglobulie de Vaquez (PV) (*voir en annexe 1 pour une description succincte concernant ces pathologies*). Pourtant, ce ne sont que des preuves indirectes et aucune étude n'a mis en évidence le potentiel procoagulant de ces cellules à l'aide de systèmes d'étude de la coagulation. La thrombinographie nous est apparue comme une méthode d'exploration de choix dans ce contexte.

L'objectif de notre travail est donc d'étudier le potentiel procoagulant supposé des polynucléaires dans ce type d'hémopathie, et d'évaluer leur éventuelle contribution à la thrombogenèse, afin de répondre à la question suivante :

*Sur la base des observations décrites dans la partie C.II.3, les PN de patients atteints de SMP JAK2<sup>V617F</sup> positif sont-ils plus procoagulants que les PN d'une population-témoin, dans un système d'étude de la génération de thrombine ?*

En effet, la mise en évidence d'un effet procoagulant des polynucléaires serait un argument supplémentaire dans la mise en œuvre de stratégies thérapeutiques cytoréductrices globales (réduisant ainsi la lignée leucocytaire en plus de la lignée atteinte - plaquettaire ou érythrocytaire -), en utilisant par exemple l'hydroxyurée – HYDREA®, par rapport aux traitements ne s'attaquant qu'à la prolifération que de la lignée majoritairement atteinte, comme c'est le cas dans le thrombocytémie essentielle, avec l'anagrélide – XAGRID®.

## C.IV.2- Patients et méthodes

### C.IV.2.1 Sujets

#### C.IV.2.11 Population-patient

Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2008, 26 patients consécutifs atteints de SMP JAK2<sup>V617F</sup> positif (PV ou TE) ont été inclus dans l'étude. Les sujets ont été recrutés lors du diagnostic ou lors du suivi évolutif de leur maladie à l'occasion d'une consultation au CHU de Nancy dans le Service d'Hématologie et Médecine Interne (Pr Lederlin) et dans le Service d'Hématologie

Biologique (Pr Lecompte). Pour être inclus dans l'étude, les patients devaient être majeurs, porteurs d'un SMP conformément aux référentiels internationaux (voir annexe 2), avec présence de la mutation V617F de JAK2, avoir été informés et avoir signé un consentement éclairé. N'ont pas été inclus dans l'étude, les patients en situation clinique non stationnaire ou en cours de transformation leucémique ; ou présentant une infection bactérienne, virale ou fongique de moins de 4 semaines ; ou une inflammation importante ; ou une neutropénie ; enfin les patients sous traitement anticoagulant (AVK, HNF, HBPM, fondaparinux) ont également été exclus.

Les données clinico-biologiques relatives à chaque patient ont été collectées à l'aide d'une fiche standard (annexe 3).

#### **C.IV.2.12 Population-témoin**

Une population-témoin a été constituée en parallèle. Vingt-six sujets témoins ont été recrutés à l'occasion d'un don de sang, de plasma ou de plaquettes à l'Etablissement Français du Sang Lorraine-Champagne, site de Brabois. Ceux-ci devaient répondre aux critères de qualification du don de sang, avoir été informés de leur participation à l'étude et signé un consentement éclairé. La population-témoin a été appariée avec la population-patient sur l'âge et le sexe ; en conséquence le recrutement de donneurs d'âge compris entre 50 et 65 ans (âge maximal pour un don) a été privilégié.

#### **C.IV.2.2 Prélèvements sanguins**

Pour chaque patient, ont été prélevés par le personnel qualifié, en plus du bilan prévu à la consultation, 25 mL supplémentaires (5x5mL) de sang veineux, anticoagulé par le citrate trisodique 0,106 M (1 volume pour 9 volumes de sang total) à l'aide de tube MONOVETTE® (Sarstedt), recommandés pour les études en thrombinographie.

Pour chaque témoin, un prélèvement de 15 mL (3x5mL, quantité maximale collectable) a été effectué avant le don.

#### **C.IV.2.3 Protocoles expérimentaux**

Les polynucléaires de patients et de donneurs ont été isolés à partir du sang total citraté selon le protocole décrit en C.I.1 afin d'obtenir un PN-RP ajusté à différentes concentrations en PN. De même ont été également préparés du plasma pauvre en plaquettes (5 G/L, PPP) et dépourvu en plaquettes (PDP) comme décrit précédemment. Enfin, du plasma riche en plaquettes (PRP) a été également préparé.

La génération de thrombine par méthode CAT® a été mesurée dans la population-patient et dans la population-témoin, après déclenchement par du facteur tissulaire à 1 pM, en présence de phospholipides (4 µM). Les paramètres CAT® (ETP, temps de latence et pic de thrombine) sont notés. Les protocoles et conditions expérimentales sont identiques à celles énoncées dans la partie C.II.2. Brièvement, le PN-RP 10 G/L est l'échantillon analytique de base. Il est comparé aux PDP et PPP autologues. Dans chaque groupe, l'effet de la présence de PN à 10 G/L dans le plasma est évalué par le calcul des différences  $\Delta$ ETP,  $\Delta$ Temps de latence et  $\Delta$ Pic :

$$\Delta\text{ETP}_{\text{PDP}} = \text{ETP}_{\text{PN-RP 10G/L}} - \text{ETP}_{\text{PDP}} ;$$

$$\Delta\text{ETP}_{\text{PPP}} = \text{ETP}_{\text{PN-RP 10G/L}} - \text{ETP}_{\text{PPP}} ;$$

$$\Delta\text{T Latence}_{\text{PDP}} = \text{T Latence}_{\text{PN-RP 10G/L}} - \text{T latence}_{\text{PDP}} ;$$

$$\Delta\text{T Latence}_{\text{PPP}} = \text{T Latence}_{\text{PN-RP 10G/L}} - \text{T latence}_{\text{PPP}} ;$$

$$\Delta\text{Pic}_{\text{PDP}} = \text{Pic}_{\text{PN-RP 10G/L}} - \text{Pic}_{\text{PDP}} ;$$

$$\Delta\text{Pic}_{\text{PPP}} = \text{Pic}_{\text{PN-RP 10G/L}} - \text{Pic}_{\text{PPP}}.$$

Les différences  $\Delta$  ont été ensuite comparées entre les 2 groupes (voir analyse statistique).

Quand la quantité de cellules recueillies l'a permis, des PN-RP à 5 G/L et 15 G/L ont également été étudiés et l'analyse réalisée sur le même principe, dans l'objectif secondaire de comparer l'effet de la concentration en PN entre les 2 groupes.

#### C.IV.2.4 Analyse statistique

L'analyse statistique et l'interprétation des données ont été réalisées avec le logiciel SAS® avec l'aide de Madame le Docteur Fabienne Empereur du Service d'Epidémiologie et Evaluation Cliniques du CHU de Nancy. Pour chaque population, les valeurs d'ETP, temps de latence et pic pour chaque milieu (PN-RP, PPP, PDP) ainsi que les différences  $\Delta$  ont été comparées par le test T de Wilcoxon. Une valeur de  $p$  inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

## C.IV.3- Résultats

### C.IV.3.1 Caractéristiques des populations étudiées

Cinquante deux sujets ont été inclus dans l'étude, parmi lesquels 26 patients (10 TE et 16 PV), dont 13 sont de sexe masculin et 13 de sexe féminin. L'âge moyen est de  $62 \pm 13$  ans (âge médian 65 ans). En parallèle, 26 témoins ont été inclus, parmi lesquels 16 hommes et 10 femmes. L'âge moyen est de  $57 \pm 4$  ans (âge médian 58 ans).

Les principales caractéristiques clinico-biologiques des populations sont présentées dans le tableau 17.

### C.IV.3.2 Tests de génération de thrombine

Sur les 26 patients inclus, seules les données des tests de génération de thrombine de 22 patients sont disponibles et analysables : 4 patients (de sexe féminin) atteints de PV ont été exclus *a posteriori* pour raisons techniques. Toutes les données sont en revanche disponibles dans la population-témoin.

#### **C.IV.3.21 Pré-requis – confirmation de l'effet procoagulant des PN**

L'analyse préalable des données recueillies montre des résultats globaux similaires à ceux obtenus dans la partie C.II.3 : la présence de PN dans le plasma à la concentration de 10 G/L induit un phénotype procoagulant se traduisant par une diminution significative du temps avant génération explosive de thrombine associée à une augmentation de l'ETP et du pic de thrombine (tableau 18). Cet effet procoagulant est noté dans les 2 populations, patients et témoins. Ce pré-requis indispensable est donc bien rempli dans l'objectif de cette étude, et la comparaison de l'effet (et de son intensité) des PN sur la génération de thrombine entre les 2 populations est donc réalisable.

#### **C.IV.3.22 Génération de thrombine à l'état basal**

Il convient de souligner d'emblée une donnée assez surprenante. La génération de thrombine est différente à l'état basal (PDP) entre patients et témoins (tableau 18 et figure 48), mais dans un sens inattendu : l'ETP de base est significativement plus bas chez les patients atteints de SMP JAK2<sup>V617F</sup> positif (pourtant considérés comme une population à risque thrombotique) que dans la population témoin ; les autres paramètres ne montrent pas de différences statistiquement significatives. En PN-RP 10 G/L, la génération de thrombine, est également différente entre les 2 populations mais les données restent cohérentes, c'est-à-



dire que même si l’ETP augmente par rapport aux PDP et PPP, chez les patients celui-ci reste systématiquement plus bas (figures 48 et 49).

**Tableau 17 : Caractéristiques clinico-biologiques principales des sujets inclus dans l’étude**

|                                                                       |                                          | Population-patient |               |               | Population-témoin |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------|---------------|---------------|-------------------|
|                                                                       |                                          | Globale            | PV            | TE            |                   |
| <b>N</b>                                                              |                                          | 26                 | 16            | 10            | 26                |
| <b>Homme / Femmes</b>                                                 |                                          | 13 / 13            | 8 / 8         | 5 / 5         | 16 / 10           |
| <b>Age moyen</b><br>[min - max]                                       |                                          | 62<br>[27-83]      | 59<br>[27-78] | 68<br>[55-83] | 57<br>[52-63]     |
| <b>Hémogramme au diagnostic</b>                                       | Hb (g/dL)                                | 17,1<br>± 2,5      | 18,6<br>± 1,8 | 14,7<br>± 1,4 |                   |
|                                                                       | Ht                                       | 52,3<br>± 8,0      | 56,9<br>± 6,0 | 45,0<br>± 4,5 |                   |
|                                                                       | Plaquettes (G/L)                         | 655<br>± 300       | 542<br>± 191  | 836<br>± 361  |                   |
|                                                                       | Leucocytes (G/L)                         | 11,4<br>± 3,8      | 11,2<br>± 3,7 | 11,7<br>± 4,1 |                   |
|                                                                       | P neutrophiles (G/L)                     | 8,7<br>± 3,2       | 8,7<br>± 2,9  | 8,6<br>± 3,7  |                   |
| <b>Hémogramme lors de l’inclusion</b>                                 | Hb (g/dL)                                | 14,3<br>± 1,6      | 15,1<br>± 1,3 | 13,2<br>± 1,4 | 14,8 ± 1,4        |
|                                                                       | Ht                                       | 43,7<br>± 5,3      | 46,1<br>± 4,1 | 40,0<br>± 5,1 | 44,0 ± 3,6        |
|                                                                       | Plaquettes (G/L)                         | 446<br>± 244       | 382<br>± 141  | 549<br>± 336  | 254 ± 42          |
|                                                                       | Leucocytes (G/L)                         | 9,0<br>± 4,3       | 9,2<br>± 4,5  | 8,6<br>± 4,4  | 5,9 ± 1,5         |
|                                                                       | P neutrophiles (G/L)                     | 6,6<br>± 3,9       | 6,8<br>± 4,1  | 6,2<br>± 3,9  | ND                |
| <b>Antécédents vasculaires</b><br>(veineux, artériels ou ischémiques) |                                          | 8                  | 3             | 5             |                   |
| <b>Traitement</b>                                                     | Cytoréducteur                            | 15                 | 8             | 7             |                   |
|                                                                       | Inhibiteur fonctions plaquettaires (IFP) | 21                 | 12            | 9             |                   |
|                                                                       | Cytoréducteur + IFP                      | 13                 | 6             | 7             |                   |
|                                                                       | Anagrélide                               | 1                  | 1             | /             |                   |
|                                                                       | Saignées                                 | 5                  | 5             | /             |                   |
|                                                                       | Interféron                               | 1                  | 1             | /             |                   |
|                                                                       | Aucun                                    | 2                  | 1             | 1             |                   |

Tableau 18 : Comparaison des paramètres de génération de thrombine au sein des 2 populations

|                         | ETP<br>(nM.min)             |               |              | Temps de latence<br>(min)    |                |       | Pic<br>(nM)               |             |       |
|-------------------------|-----------------------------|---------------|--------------|------------------------------|----------------|-------|---------------------------|-------------|-------|
|                         | Patients                    | Témoins       | P            | Patients                     | Témoins        | P     | Patients                  | Témoins     | P     |
| <b>PDP</b>              | <b>1241</b><br><b>± 287</b> | 1457<br>± 297 | <b>0,016</b> | <b>6,16</b><br><b>± 1,26</b> | 6,95<br>± 2,10 | 0,232 | <b>183</b><br><b>± 61</b> | 211<br>± 74 | 0,195 |
| <b>PPP<br/>5 G/L</b>    | <b>1329</b><br><b>± 290</b> | 1486<br>± 279 | <b>0,059</b> | <b>6,08</b><br><b>± 1,26</b> | 6,96<br>± 2,01 | 0,125 | <b>195</b><br><b>± 60</b> | 221<br>± 76 | 0,283 |
| <b>PN-RP<br/>10 G/L</b> | <b>1507</b><br><b>± 313</b> | 1668<br>± 292 | <b>0,017</b> | <b>5,85</b><br><b>± 1,27</b> | 6,53<br>± 1,65 | 0,143 | <b>234</b><br><b>± 72</b> | 273<br>± 81 | 0,098 |

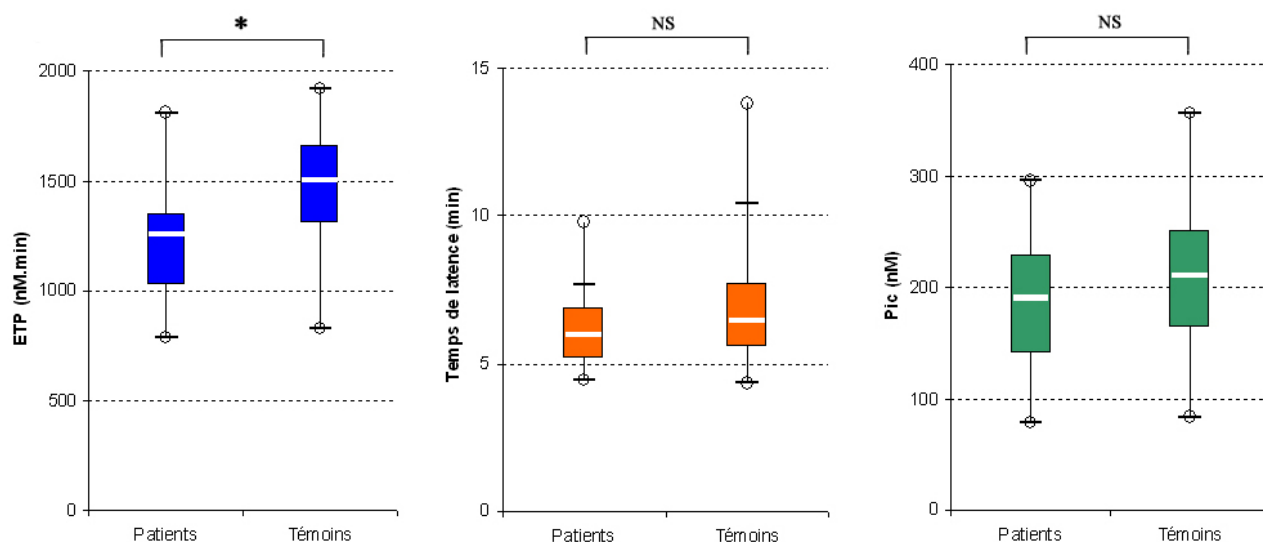


Figure 48 : Paramètres CAT® en PDP entre patients et témoins (\* P<0,05 ; NS non significatif)

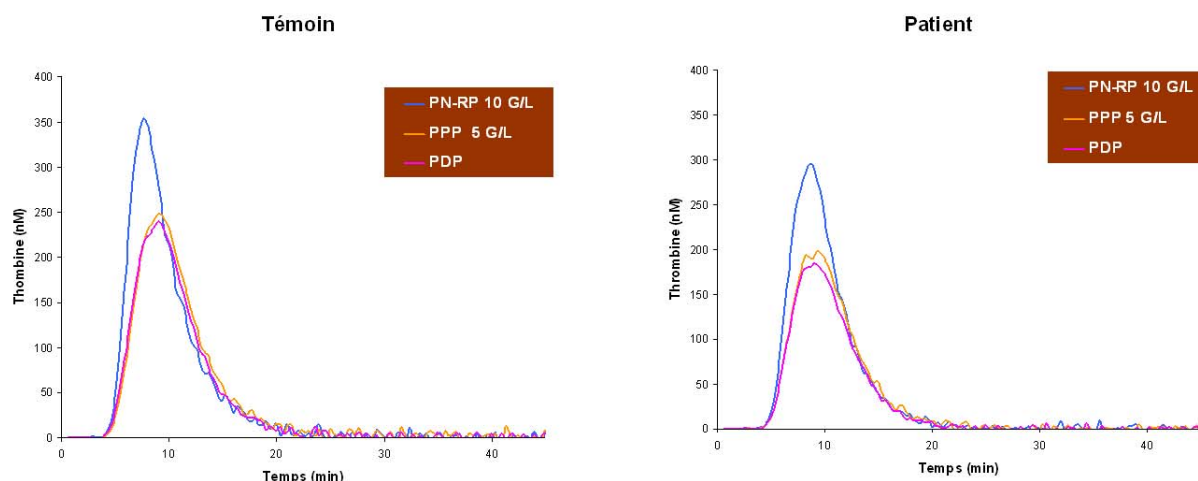


Figure 49: Profils-type de génération de thrombine dans la population-témoin et la population-patient

#### C.IV.3.23 Comparaison des différences $\Delta$

Concernant la comparaison de l'activité procoagulante des PN entre patients et témoins – objectif principal de cette étude –, l'analyse statistique des différences  $\Delta$  (quantifiant l'effet des PN à 10 G/L par rapport aux PDP et PPP) ne montre aucune différence entre les 2 populations quel que soit le paramètre étudié. Dans nos conditions d'observations, les PN à 10 G/L issus de patients atteints de SMP JAK2<sup>V617F</sup> positifs n'apparaissent donc pas plus procoagulants que ceux issus de la population-témoin (tableau 19). Notre hypothèse initiale n'est donc pas satisfaite.

Il en est globalement de même pour les autres concentrations en PN, 5 et 15 G/L.

Tableau 19 : Comparaison (valeur de P patients vs témoins) des différences  $\Delta$  (par rapport au PDP et au PPP 5G/L).

| a. $\Delta$ ETP       | PPP 5 G/L | PDP   |
|-----------------------|-----------|-------|
| PN-RP 10 G/L          | 0,910     | 0,479 |
| b. $\Delta$ T Latence |           |       |
| PN-RP 10 G/L          | 0,320     | 0,510 |
| c. $\Delta$ Pic       |           |       |
| PN-RP 10 G/L          | 0,430     | 0,572 |

#### C.IV.3.24 Effet de la concentration en PN

Il existe toujours une différence statistiquement significative des ETP entre les 2 populations quelle que soit la concentration en PN (tableau 20). Toutefois, si l'ETP augmente avec la concentration en PN dans la population-témoin, il ne varie plus entre les concentrations en PN 10 et 15 G/L dans la population-patient.

Ces résultats sont à prendre avec un peu de réserve car les effectifs des groupes sont moins homogènes, les données n'étant pas disponibles pour tous les individus (N=20 ou 25 selon les groupes et les concentrations en PN étudiées).

Enfin, la génération de thrombine en présence de PN à 15 G/L est significativement différente d'une façon globale, car sur les 3 paramètres CAT®, entre les 2 populations, patients et témoins, on peut noter que le temps de latence est significativement plus bas, ce qui pourrait traduire un effet procoagulant.

Toutefois, la comparaison entre patients et témoins des différences  $\Delta$  (par rapport au PDP natif) pour chaque paramètre a été également réalisée en fonction des concentrations 5 et 15 en PN et ne montre comme précédemment aucune différence significative d'effet entre les 2 populations. On peut remarquer que chez les patients, les différences d'effets entre les concentrations 10 et 15 G/L sont distinctes de celles observées chez les témoins : le pic et l'ETP n'augmente pas autant alors que le temps de latence diminue.

Au total et dans ce système expérimental, l'augmentation de la concentration en PN ne se traduit pas par une hypercoagulabilité plus importante dans les SMP JAK2<sup>V617F</sup> positif.

**Tableau 20 : Comparaison des paramètres de génération de thrombine au sein des 2 populations en fonction de la concentration en PN (\*N=20 ; \*\*N=25)**

|                         | ETP<br>(nM.min)         |                 |              | Temps de latence<br>(min) |                  |              | Pic<br>(nM)           |               |              |
|-------------------------|-------------------------|-----------------|--------------|---------------------------|------------------|--------------|-----------------------|---------------|--------------|
|                         | Patients                | Témoins         | P            | Patients                  | Témoins          | P            | Patients              | Témoins       | P            |
| <b>PN-RP<br/>5 G/L</b>  | <b>1374**<br/>± 314</b> | 1525**<br>± 304 | <b>0,029</b> | <b>5,85**<br/>± 1,25</b>  | 6,65**<br>± 1,76 | 0,086        | <b>209**<br/>± 65</b> | 247**<br>± 79 | 0,084        |
| <b>PN-RP<br/>10 G/L</b> | <b>1507<br/>± 313</b>   | 1668<br>± 292   | <b>0,017</b> | <b>5,85<br/>± 1,27</b>    | 6,53<br>± 1,65   | 0,143        | <b>234<br/>± 72</b>   | 273<br>± 81   | 0,098        |
| <b>PN-RP<br/>15 G/L</b> | <b>1501**<br/>± 286</b> | 1799*<br>± 266  | <b>0,002</b> | <b>5,66**<br/>± 1,29</b>  | 6,66*<br>± 1,67  | <b>0,044</b> | <b>245**<br/>± 71</b> | 299*<br>± 78  | <b>0,038</b> |

### C.IV.3.25 Comparaison Polyglobulie de Vaquez / Thrombocytémie Essentielle

Les paramètres CAT® ont été comparés entre les patients atteints de PV (N=12) et ceux atteints de TE (N=10) par le test U de Mann-Whitney (tableau 21). Aucune différence n'est notée entre les 2 groupes, que cela soit sur la génération de thrombine basale en PDP ou en présence de PN.

Tableau 21 : Comparaison des paramètres de génération de thrombine entre les patients atteints de PV et ceux atteints de TE

|                               | ETP<br>(nM.min)             |               |       | Temps de latence<br>(min)    |                |       | Pic<br>(nM)               |             |       |
|-------------------------------|-----------------------------|---------------|-------|------------------------------|----------------|-------|---------------------------|-------------|-------|
|                               | PV                          | ET            | P     | PV                           | ET             | P     | PV                        | ET          | P     |
| <b>PDP</b>                    | <b>1206</b><br><b>± 270</b> | 1282<br>± 315 | 0,510 | <b>6,07</b><br><b>± 1,53</b> | 6,26<br>± 0,90 | 0,222 | <b>168</b><br><b>± 55</b> | 200<br>± 66 | 0,356 |
| <b>PPP</b><br><b>5 G/L</b>    | <b>1293</b><br><b>± 256</b> | 1373<br>± 335 | 0,391 | <b>5,93</b><br><b>± 1,54</b> | 6,26<br>± 0,87 | 0,235 | <b>181</b><br><b>± 58</b> | 212<br>± 60 | 0,235 |
| <b>PN-RP</b><br><b>10 G/L</b> | <b>1488</b><br><b>± 264</b> | 1531<br>± 378 | 0,792 | <b>5,76</b><br><b>± 1,43</b> | 5,96<br>± 1,11 | 0,468 | <b>216</b><br><b>± 64</b> | 254<br>± 80 | 0,323 |

## C.IV.4- Discussion

### Populations étudiées

Les 2 populations étudiées, patients atteints de SMP et témoins, sont homogènes et comparables en terme d'effectifs, d'âge et de sex-ratio. On peut toutefois émettre une réserve concernant l'âge, car si l'âge moyen est proche entre les 2 populations, la répartition n'est pas tout à fait identique ; cela s'explique par le mode de recrutement des donneurs pour lesquels il est impossible de dépasser 65 ans (limite d'âge pour un don). Ce biais n'a probablement pas une incidence majeure, car seuls 8 patients sur les 26 inclus ont plus de 70 ans.

En revanche et sans surprise, les 2 populations diffèrent par les paramètres moyens de l'hémogramme. Concernant les témoins, les valeurs moyennes sont dans la fourchette des valeurs attendues ; le compte différentiel des leucocytes n'est pas réalisé en routine après un don à l'EFS, ainsi le nombre de PN pour les témoins n'est pas disponible. Cependant, au vu

du nombre normal de leucocytes totaux, on peut facilement extrapoler que le nombre des PN est également normal.

Concernant les patients, on note des paramètres hématologiques moyens au moment du diagnostic conformes à ce à quoi on peut s'attendre dans ce type de pathologies : Hb et Ht augmentés, hyperplaquettose et leucocytose dans la population PV ; hyperplaquettose et leucocytose seulement dans la population TE. Il est remarquable de noter la tendance moyenne à la baisse (voire à la normalisation) de ces paramètres mesurés au moment de l'étude, sans aucun doute lié à la prise en charge thérapeutique. Du point de vue de la leucocytose, l'analyse détaillée des données (non développée ici) fait état que 23 patients (sur 26) présentaient une polynucléose neutrophile > 6 G/L au moment du diagnostic, dont 19 étaient associés à une leucocytose > 10 G/L. Au moment de l'étude, sur ces 23 patients précédents, 12 présentaient toujours cette polynucléose neutrophile > 6 G/L, dont 8 associée à une leucocytose > 10 G/L. Aucun patient n'a développé une hyperleucocytose entre le moment du diagnostic et celui de l'étude.

Concernant les traitements, un peu plus de la moitié bénéficie d'un traitement cytoréducteur (hydroxyurée dans 2/3 des cas). Une grande majorité des patients PV et la quasi-totalité des patients TE sont sous inhibiteur des fonctions plaquettaires (aspirine dans 100% des cas), systématiquement associée à un cytoréducteur pour les TE.

La quasi-totalité des patients (23 sur 26) présente des facteurs de risque cardiovasculaires (HTA, tabac, dyslipémie, antécédents familiaux...), mais seuls 8 ont présenté un événement vasculaire.

### ***Génération de thrombine à l'état basal***

Avant même de commenter l'effet des PN et de répondre à notre hypothèse de base, il convient de discuter une donnée surprenante et inattendue. En effet, il apparaît que, sur la base de l'ETP et en conditions normales (PDP), les patients atteints de SMP sont significativement hypocoagulables par rapport à notre population-témoin (ETP moyen = 1241 vs 1457 nM.min, respectivement). Ce type de pathologies exposant à un risque thrombotique important, on pouvait résolument s'attendre à ce que la population-patient présente à l'état basal un phénotype hypercoagulable sur au moins un des paramètres CAT®. Du fait de la démocratisation récente des tests de génération de thrombine, peu de données sont disponibles dans la littérature, seulement débutante à ce sujet. Toutefois, quelques résultats sont publiés (ou sont en cours de publication) depuis la fin 2008. Et particulièrement, Marchetti a étudié une population de 59 patients TE et de 30 PV, présentant ou non la mutation V617F de

JAK2 [Marchetti, 2008] : la génération de thrombine, sous l'angle de la recherche d'une résistance acquise à la PCa, a été réalisée en plasma pauvre en plaquettes, mais dans des conditions déclenchantes sensiblement différentes de celles de notre étude (FT 6,8 pM ; PLa 30 µM ; avec ou sans ajout de PCa). Concernant les données sans PCa, correspondant aux paramètres à l'état basal comme dans notre étude (figure 50), il y apparaît clairement une différence d'ETP chez la plupart des patients, dans le sens d'une hypocoagulabilité, et uniquement avec les patients porteurs de la mutation V617F de JAK2.

|                       | -APC                 |                  |          |
|-----------------------|----------------------|------------------|----------|
|                       | Lag time,<br>minutes | ETP,<br>nM · min | Peak, nM |
| Controls              | 1.93 ± 0.34          | 821 ± 118        | 248 ± 34 |
| <b>ET</b>             | 1.94 ± 0.33          | 760 ± 177*       | 242 ± 54 |
| Negative (n = 29)     | 1.96 ± 0.31          | 800 ± 168        | 249 ± 58 |
| Heterozygous (n = 30) | 1.91 ± 0.35          | 716 ± 179†       | 236 ± 49 |
| <b>PV</b>             | 1.88 ± 0.36          | 725 ± 166†       | 235 ± 51 |
| Negative (n = 3)      | 2.01 ± 0.08          | 856 ± 288        | 274 ± 84 |
| Heterozygous (n = 17) | 1.87 ± 0.42          | 727 ± 88†        | 228 ± 41 |
| Homozygous (n = 10)   | 1.85 ± 0.32          | 684 ± 217†       | 236 ± 56 |

\*P < .05 versus controls.  
†P < .01 versus controls.

**Figure 50 : Comparaison des paramètres CAT® à l'état basal (sans PCa), selon la pathologie et selon le statut JAK2**  
d'après Marchetti, 2008

Malheureusement, cette donnée n'est pas commentée par les auteurs... cependant, d'autres données exposées dans la même étude sont susceptibles de fournir un début d'explication. En effet, il est également noté que les patients porteurs de la mutation V617F ont des concentrations en prothrombine et en FV significativement plus basses que dans le groupe contrôle. Une diminution du FII, ainsi que du FVII et du FX, a déjà été mentionnée dans une autre étude [Jensen, 2002]. La diminution du FV a également déjà été reportée [Takahashi, 1982]. Ceci pourrait expliquer la diminution du travail thrombinique au cours du temps.

### **Potentiel procoagulant des PN**

La présence de PN dans le plasma a induit des modifications attendues du profil de génération de thrombine, dans le sens d'une hypercoagulabilité (diminution du temps de latence, de l'ETP et du pic), conformément aux effets décrits dans la partie C.II.3. Toutefois, l'hypercoagulabilité induite par les PN chez les patients n'est pas différente de celle notée chez les témoins. Par conséquent, dans le système d'étude choisi, l'hypercoagulabilité

« clinique » des patients atteints de SMP ne s'explique pas par le potentiel procoagulant des PN. Notre hypothèse initiale n'est donc pas vérifiée.

De prime abord, le résultat brut de ces expérimentations peut paraître inattendu. En effet, nous avons montré dans les parties précédentes que l'activation des PN favorise plus encore leur potentiel procoagulant. Or, les PN de patients atteints de SMP circulent à l'état activé [Falanga, 2000]. On aurait donc été en droit de s'attendre à une accentuation de l'effet des PN chez les patients par rapport aux témoins. Plusieurs éléments de commentaire peuvent être fournis :

- En premier lieu, l'activation des PN notée dans l'étude citée ci-dessus n'est pas très intense. En effet, le marqueur membranaire utilisé CD11b est celui qui est le plus rapidement surexprimé « dès la moindre stimulation », car contenu dans les vésicules sécrétoires qui sont exocytées les premières [Sengeløv, 1993]. Aussi, les concentrations d'HNE plasmatique mesurées sont 1,5 fois supérieures à celle des témoins, ce qui est très peu par rapport à l'augmentation observée dans les contextes où les PN sont très activés : x5 à x30 dans des contextes de sepsis avec CIVD, x5 à x10 sans CIVD associée [Gando, 2005], ce qui suggère, certes une activation, mais qui est loin d'être complète.

- Ensuite, il ne faut pas négliger que les SMP constituent un contexte tumoral et donc il est attendu que les cellules associées soient fonctionnellement anormales. Il est d'ailleurs décrit de nombreuses altérations métaboliques et fonctionnelles du PN dans ces situations [Samuelsson, 1988 ; Samuelsson, 1991 ; Burgaleta, 2002]. Ces altérations peuvent retentir sur la façon dont ils agissent sur la génération de thrombine dans les conditions que nous avons choisies et éventuellement, à l'extrême, masquer un pouvoir procoagulant plus important.

- Enfin, il n'est pas impossible que les PN, à travers la notion d'hyperleucocytose, soient de simples « témoins innocents » de l'hypercoagulabilité associée au SMP et qu'ils n'interviennent pas au niveau physiopathologique. Cette hypothèse n'est pas la plus plausible ne serait-ce qu'aux vues des autres données présentées dans ce travail et ne devra être privilégiée qu'en cas d'impossibilité à mettre en évidence un potentiel procoagulant supérieur des PN par d'autres approches et conditions expérimentales.

- Une des limites de notre étude est qu'elle ne prend pas en compte le système de la PC/PS/TM. Or Marchetti a récemment montré par étude de la génération de thrombine un état



de résistance à la PCa chez les patients atteints de TE et PV, plus marqué chez les porteurs de la mutation V617F de JAK2 [Marchetti, 2008]. Les auteurs attribuent entre autres cet état d'hypercoagulabilité à la baisse significative de la PS. Mais surtout, cette diminution de la PS est significativement corrélée à la concentration plasmatique en HNE, ce qui suggère à nouveau un lien fort entre PN, activation et hypercoagulabilité, sans toutefois le démontrer expérimentalement.



## MEMO

*Dans nos conditions d'observations, les PN de patients atteints de SMP JAK2<sup>V617F</sup> positif (Polyglobulie de Vaquez et Thrombocytémie essentielle) ne sont pas plus procoagulants que ceux d'une population-témoin du sujet sains appariée sur l'âge et le sexe. Parallèlement, ce type de patients réputés « hypercoagulables » est trouvé ici « hypocoagulable » par rapport aux témoins, sur la base du potentiel thrombinique endogène.*



## Références

- Burgaleta C, González N, César J. Increased CD11/CD18 expression and altered metabolic activity on polymorphonuclear leukocytes from patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Acta Haematol.* 2002;108:23-8.
- Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, Manarini S, Finazzi G, Cerletti C, Barbui T. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 2000;96:4261-6.
- Gando S, Kameue T, Matsuda N, Hayakawa M, Hoshino H, Kato H. Serial changes in neutrophil-endothelial activation markers during the course of sepsis associated with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 2005;116:91-100.
- Jensen MK, de Nully Brown P, Thorsen S, Hasselbalch HC. Frequent occurrence of anticardiolipin antibodies, Factor V Leiden mutation, and perturbed endothelial function in chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol.* 2002;69:185-91.
- Marchetti M, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Balducci D, Barbui T, Rosing J, Ten Cate H, Falanga A. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 2008;112:4061-8.
- Samuelsson J, Berg A. Further studies of defective stimulus-response coupling for the oxidative burst in neutrophils in polycythemia vera. *Eur J Haematol* 1991;47:239-245.
- Samuelsson J, Lindström P, Paimbland J. Stimulus-specific defect in oxidative metabolism of polymorphonuclear granulocytes in polycythemia vera. *Eur J Haematol* 1988;41:454-458.
- Sengeløv H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 ( $\alpha\text{M}\beta 2$ ) in human neutrophils. *J Clin Invest.* 1993;92:1467-76.
- Takahashi H, Hattori A, Shibata A. Profile of blood coagulation and fibrinolysis in chronic myeloproliferative disorders. *Tohoku J Exp Med.* 1982;138:71-80.

**D.**

**CONCLUSION**

**GENERALE ET**

**PERSPECTIVES**

S'il est clair que les PN sont recrutés activement lors de la coagulation et que leur présence dans les caillots n'est pas fortuite, la littérature leur attribue de nombreux effets potentiels, parfois dans des sens opposés et contradictoires. D'aucuns estiment que les PN sont activement recrutés lors de la constitution du caillot pour faciliter, grâce à leur arsenal enzymatique, son élimination ultérieure ainsi que le remodelage tissulaire après lésion [Rulot, 1904], alors que d'autres considèrent qu'ils contribuent directement à l'initiation de sa formation, par exemple lors de la maladie thromboembolique veineuse, par l'intermédiaire de leur propriétés adhésives notamment [Wakefield, 1997].

Le but de ce travail était d'évaluer l'impact global des PN sur la coagulation, pour tenter de clarifier ces données. Aussi, pour ce faire, nous avons retenu un milieu d'étude le plus simple possible afin de limiter au maximum les interactions cellulaires complexes et pour mieux dégager l'impact propre des PN. En parallèle 2 enzymes granulocytaires, régulièrement citées comme pouvant expliquer tout ou partie de leur contribution dans les mécanismes, ont été étudiées.

### **Qualité des suspensions cellulaires**

Nous devons tout d'abord disposer des populations cellulaires « de bonne qualité ». Nous avons réalisé la majeure partie de nos expérimentations avec du sang issu de sujets sains (donneurs de sang ou personnel du laboratoire), exempts de toute infection (qui pourrait altérer les fonctionnalités du PN) et n'ayant pris aucun médicament interférant avec l'hémostase (Aspirine et autres AINS principalement) ; le recrutement étant limité, les expérimentations présentées ici sont parfois en nombre restreint.

Nous avons montré que la procédure de séparation des PN des autres éléments figurés du sang n'altère pas leur viabilité ni leur réactivité. En revanche, les résultats indiquent que les isolats de PN contiennent encore une faible proportion de plaquettes et de monocytes, qui sont susceptibles de perturber l'interprétation ultérieure des tests. Toutefois, plusieurs éléments indiquent que cette présence résiduelle n'a très vraisemblablement que peu de répercussions sur les tests de coagulation que nous avons menés :

- L'enrichissement en PN des isolats est considérable : puisqu'on compte en moyenne 5 PN pour 1 plaquette, pour environ 200 plaquettes pour 5 PN dans le sang total.
- Pour évaluer l'impact de la contamination plaquettaire résiduelle des isolats et par mesure de précaution, tous les essais ont systématiquement été menés en parallèle avec un

plasma contenant 5 G/L en plaquettes. Les comparaisons des paramètres aussi bien ROTEM® que CAT® montrent qu'il n'existe aucune différence significative avec le plasma natif dépourvu en plaquettes. Ceci indique qu'une concentration résiduelle plaquettaire faible, comme c'est le cas dans nos isolats de PN, a très peu (voire pas du tout) d'impact sur la constitution du réseau de fibrine et la génération de thrombine dans nos conditions.

- Quant à la contamination monocyttaire, qui pourrait perturber l'interprétation des tests surtout au niveau de l'initiation de la coagulation (puisque les monocytes sont capables d'exposer le FT à leur surface), elle est également négligeable ici : la proportion d'1 % de monocytes résiduels est acceptable ; selon la littérature seule leur présence au-delà de 3 % dans une suspension de PN peut rendre délicate l'interprétation de tests de coagulation [Hair, 1996]), et les résultats montrent que la voie du facteur tissulaire n'est pas mise en jeu dans nos observations.

Par conséquent, les effets mis en évidence dans le PN-RP doivent être considérés comme directement imputables aux PN.

### ***Impact des PN sur la coagulation***

Nous avons utilisé des dispositifs d'étude de la coagulation tels que la thromboélastométrie rotative - ROTEM® ou le système CAT® afin d'avoir une vue aussi globale que possible du processus. Nos résultats indiquent clairement que les PN ne sont pas inertes vis-à-vis de la coagulation et que leur recrutement dans le caillot constaté *in vivo* [Henri, 1965] a très vraisemblablement des conséquences sur la poursuite du phénomène. D'une façon générale, la présence de PN favorise son déroulement, ce qui se traduit par une réduction du temps de gélification du plasma de 10 à 30 % par rapport aux contrôles selon les méthodes d'étude : en ROTEM®,  $800 \pm 134$  s en présence de PN 10 G/L vs  $1234 \pm 149$  s ; en CAT®,  $6,05 \pm 1,12$  min vs  $6,64 \pm 1,15$  min.

Nos données montrent également qu'au-delà du changement de phase du milieu, la présence de PN permet une augmentation significative de 30 % du travail thrombinique total ( $2029 \pm 803$  nM.min en présence de PN vs  $1579 \pm 581$  nM.min).

Si l'étude mécanistique complète n'a pu être engagée, il semble clair que l'activité procoagulante observée n'est pas due à une activité facteur tissulaire, puisque présente en dehors de toute stimulation préalable. Une des hypothèses les plus plausibles est l'implication du contenu intracellulaire libéré par exocytose associée à une perte d'efficacité des systèmes

inhibiteurs en présence de PN. Cela est conforté par les expérimentations réalisées en présence des enzymes granulocytaires purifiées, Cath G et HNE. L'une comme l'autre provoquent, dans les mêmes systèmes d'étude que les PN, une réduction du temps de coagulation attribuable à une perte d'activité anticoagulante du TFPI, principal inhibiteur de l'initiation de la génération de thrombine. La dégradation de l'AT par l'HNE expliquerait quant à elle l'augmentation du travail thrombinique total.

Ensuite, si l'hypothèse d'une exocytose des granulations est plausible pour expliquer l'activité des PN, il reste à rechercher quel stimulus l'induit en dehors de toute activation préalable des PN. C'est à ce titre que pourrait intervenir la membrane du PN (qui n'a pas été abordée dans ces travaux et devra faire l'objet d'expérimentations plus approfondies), par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques à certains agonistes (comme la (1 $\alpha$ ) fibrin(ogène) [Goel & Diamond, 2001], plutôt que sous l'angle de l'activité phospholipidique procoagulante. Un réseau de fibrine pouvant se constituer en périphérie du PN, l'environnement cellulaire pourrait alors constituer une zone d'accessibilité réduite aux inhibiteurs telle que l'AT.

Néanmoins, les 2 enzymes étudiées ici ne peuvent expliquer à elles seules les effets des PN sur la coagulation car toutes 2 font état de propriétés à la fois pro- et anticoagulantes, alors que les PN sont de façon nette procoagulants uniquement : on peut mentionner que le caillot obtenu dans un plasma riche en PN est moins solide, mais cela est vraisemblablement plus en lien avec l'absence de GPIIb/IIIa à la surface granulocytaire qu'avec un effet délétère sur celui-ci.

La signification *in vivo* de cette potentialité des PN reste mal déterminée et leur participation s'avère (sans surprise) complexe. Chez l'individu sain, cela n'a probablement pas de retentissement ; à titre d'exemples, l'étude de souris knock-out pour le gène de la Cath G n'a montré aucune perturbation de l'hémostase [MacIvor, 1999] et l'activation granulocytaire post-GM-CSF chez des sujets sains n'a pas induit de manifestations thrombotiques [Falanga, 1999]. En revanche, dans des situations d'activation excessive des PN (sepsis...) ou de la coagulation elle-même (CIVD), cela peut contribuer de façon importante.

Si ce travail a permis de dégager des axes principaux pour approfondir la compréhension de la contribution des PN à la thrombogenèse (enzymes granulaires, récepteurs membranaires), il met aussi en évidence, à travers l'étude de patients atteints de

SMP, la difficulté à définir des conditions expérimentales en adéquation avec la réalité *in vivo* et clinique. C'est en sens qu'il ouvre de nombreuses perspectives.

### **Perspectives**

La poursuite de ce travail consistera principalement à faire le lien entre les effets observés avec les PN et ceux observés avec les enzymes purifiées pour déterminer le ou les déterminants principaux.

Mais tout d'abord, les conditions expérimentales devront être affinées avec surtout l'intégration du 3<sup>ème</sup> système inhibiteur majeur de la coagulation, PC/PS/TM, même si nos données montrent clairement un effet des PN et des 2 enzymes indépendant de celui-ci. Deux options principales sont envisageables : soit par l'ajout de PCa exogène (mais qui aurait l'inconvénient de shunter/masquer un hypothétique effet des PN sur la PS ou la PC endogènes) soit par l'ajout de TM (qui au contraire permettrait d'incorporer les activités éventuelles sur ces mêmes PS et PC).

En ce qui concerne les mécanismes mis en jeu dans l'activité procoagulante des PN, il conviendra :

- ⊙ d'explorer la contribution de l'exocytose des granulations dans l'effet procoagulant des PN en utilisant un ou plusieurs inhibiteurs de la dégranulation. La recherche d'un bon inhibiteur sera primordiale, car il devra être spécifique de la dégranulation, sans retentir sur les autres fonctionnalités du PN.

- ⊙ de comparer en parallèle l'effet d'un surnageant de PN incubés en présence de divers agonistes (fMLP, P-Sel, PMA,...), et de tester l'effet d'inhibiteurs spécifiques en premier lieu de la Cath G et de l'HNE (par exemple, Z-Gly-Leu-Phe-Chloromethylketone et Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Ala-Chloromethylketone, respectivement [Goel & Diamond, 2001]).

- ⊙ d'explorer le rôle de la membrane du PN :

- ⊙ en testant les activités procoagulantes des isolats de PN avant et après activation par divers agonistes

- ⊙ en recherchant la présence de microparticules d'origine granulocytaire avant et après activation par divers agonistes



⊙ en testant l'impact d'un inhibiteur de Mac-1 par exemple en génération de thrombine.

Enfin, les perspectives concernent également la recherche de nouvelles conditions expérimentales optimales qui permettront de mettre en évidence l'hypercoagulabilité des patients atteints de SMP ; à côté de la prise en compte du système PC/PS/TM, on pense en premier lieu à l'intégration des plaquettes, auxquelles il conviendrait d'ajouter les PN à différentes concentrations. Les essais ultérieurs dans ce contexte pourraient donc comparer la génération de thrombine d'un milieu type « plasma riche en PN **et** en plaquettes **en présence de TM** ». Aussi, plus que l'état d'activation des PN des patients, leur réactivité résiduelle devra être explorée.



## Références

- Goel MS, Diamond SL. Neutrophil enhancement of fibrin deposition under flow through platelet-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:2093-8.
- Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Manarini S, Oldani E, Giovanelli S, Galbusera M, Cerletti C, Barbui T. Neutrophil activation and hemostatic changes in healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1999;93:2506-14.
- Henry RL. Leukocytes and thrombosis. *Thromb Diath Haemorrh.* 1965;13:35-46.
- MacIvor DM, Shapiro SD, Pham CT, Belaaouaj A, Abraham SN, Ley TJ. Normal neutrophil function in cathepsin G-deficient mice. *Blood.* 1999;94:4282-93.
- Rulot H. Intervention des leucocytes dans l'autolyse de la fibrine. *Arch Int Physiol Biochim.* 1904;1:152-8.
- Wakefield TW, Strieter RM, Prince MR, Downing LJ, Greenfield LJ. Pathogenesis of venous thrombosis: a new insight. *Cardiovasc Surg.* 1997;5:6-15.

# **Annexes**

## **Annexe 1 : Syndromes myéloprolifératifs : Polyglobulie de Vaquez et Thrombocyémie essentielle**

### **1. Définitions**

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des maladies hétérogènes liées à la transformation d'une cellule souche hématopoïétique par un événement moléculaire qui procure un avantage prolifératif au clone sans trouble de la différenciation. Selon la lignée majoritairement atteinte, il est possible de distinguer plusieurs types de SMP ; dans l'étude rapportée dans ce travail, nous nous sommes consacrés à la Thrombocyémie essentielle (TE), où la prolifération concerne la lignée plaquettaire, et la Polyglobulie de Vaquez (PV), où la prolifération concerne la lignée érythroïde.

La découverte récente de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> va déboucher probablement sur une redéfinition nosologique.

### **2. Polyglobulie de Vaquez**

#### *Définition et données épidémiologiques*

La Polyglobulie de Vaquez est un syndrome myéloprolifératif Phi-négatif, résultant de l'expansion clonale d'une cellule-souche hématopoïétique pluripotente, à l'origine d'une prolifération non régulée du tissu myéloïde prédominant sur la lignée érythrocytaire. Elle est rapportée dans toutes les origines ethniques, avec cependant une prédominance européenne. Son incidence est faible, de l'ordre de 3 cas pour 10 000 habitants, selon une étude épidémiologique réalisée en Italie du Nord [Référentiel SFH, 2006]. Son incidence est légèrement supérieure chez les hommes (sex ratio homme/femme allant de 1/1 à 2/1). C'est une pathologie du sujet âgé, se manifestant principalement entre 50 et 70 ans. Les cas chez l'enfant et l'adolescent sont exceptionnels.

#### *Étiologie*

La pathogénie de la PV est longtemps restée inexpliquée, jusqu'au printemps 2005, où plusieurs groupes de chercheurs ont décrit la présence dans les cellules myéloïdes des patients atteints, d'une mutation unique récurrente et activatrice dans le gène de la Janus Kinase JAK2. Cette mutation JAK2<sup>V617F</sup> confère aux lignées cellulaires une hypersensibilité et une indépendance vis-à-vis de diverses cytokines dont l'érythropoïétine. Retrouvée dans la grande majorité (> 90%) des cas de PV (et avec une fréquence moindre dans la thrombocyémie essentielle et la myélofibrose primitive), elle a ouvert la voie à un diagnostic moléculaire précis de la PV [Référentiel SFH, 2006].

#### *Présentation clinique*

Elle est discrète au début de la maladie, comprenant des manifestations périphériques des troubles primaires médullaires. Les manifestations de troubles de la coagulation (thrombose et hémorragie) peuvent dominer le tableau clinique. Les troubles thrombotiques sont rapportés chez 4,1 à 9,8 % des patients, et l'incidence annuelle est de 2 à 9 %, selon la présence ou non de facteurs de risque additionnels [Leone, 2001]. L'incidence au diagnostic varie entre 13 et 60 % et durant l'évolution, l'incidence annuelle est de 1,7 % chez les patients de moins de 40 ans et de 15 % chez les patients de plus de 60 ans [Landolfi, 2006]. Les événements artériels sont majoritaires. Les accidents ischémiques constituent une des premières causes de mortalité chez les patients non traités et représentent 30 à 40 % des événements thrombotiques. Les thromboses veineuses profondes et les phlébites superficielles ne sont pas pour autant rares, et sont localisées, comme dans la population générale, au niveau des membres inférieurs. Les thromboses inexpliquées ou de localisation exceptionnelle (thrombose mésentérique, syndrome de Budd-Chiari...) sont très évocatrices d'un SMP, type PV ou TE. Enfin, une stratification des populations de patients a été établie en fonction du risque thrombotique et de l'existence de facteurs de risque (âge > 60 ans, existence d'antécédents thrombotiques, facteurs de risques cardiovasculaires ...).

#### *Stratégie thérapeutique*

Les principales causes de morbidité et mortalité sont les troubles de coagulation, les défaillances médullaires et la transformation leucémique [Cao, 2006]. Si le principe des saignées en urgence n'est pas discutable pour des hématocrites très élevés, leur poursuite en tant que traitement de fond de la PV est beaucoup plus contestable. Le traitement de fond vise à maintenir de façon permanente l'hématocrite < 45% et la numération plaquettaire < 450 G/L. On pourra alors utiliser un traitement myélofreinateur reposant sur l'hydroxyurée ou le pipobroman, aux modalités d'action très comparables. De plus, il a été récemment démontré (étude ECLAP) que l'aspirine à faible dose et en continu représentait un traitement adjuvant utile du risque thrombotique dans la PV, sans oublier un contrôle strict des facteurs de risque cardiovasculaire associés : tabac,

diabète, hypertension artérielle, hypercholestérolémie, obésité. L'espérance de vie est sensiblement identique à celle d'une population témoin.

### **3. Thrombocytémie essentielle**

#### *Définition et données épidémiologiques*

La thrombocytémie essentielle est caractérisée par une élévation durable de la numération plaquettaire au dessus de 450 G/L et par une prolifération anormale mégacaryocytaire. Le diagnostic ne peut être posé qu'après avoir exclu toute thrombocytose réactionnelle (syndrome inflammatoire, carence martiale...) et toute prolifération des la lignée plaquettaire associée à une autre hémopathie (leucémie myéloïde chronique, splénomégalie myéloïde, PV....). Son incidence varie selon les critères diagnostiques utilisés mais peut être estimée entre 1 et 2,5 nouveau cas pour 100 000 habitants par an [Brière, 2006 ; Sanchez, 2006]. Cette incidence est peut être sous-estimée du fait de formes asymptomatiques. L'âge moyen au diagnostic varie selon les études entre 60 et 70 ans [Sanchez, 2006 ; Brière, 2007] mais la répartition en âge est particulièrement large et un second pic de fréquence survient dans la troisième décade de vie. Une autre caractéristique épidémiologique de la TE est sa prédominance dans la population féminine, particulièrement avant 40 ans. Enfin, les taux de survie des patients atteints de TE sont assez proches de ceux de la population générale.

#### *Etiologie*

L'étiologie de la TE demeure encore mal connue. Pourtant, la découverte récente de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> (cf supra) dans près de 50 % des TE a fourni un début de compréhension [Brière, 2006].

#### *Présentation clinique*

La symptomatologie clinique et les risques de la TE sont avant tout vasculaires. Il s'agit de manifestations transitoires de la microcirculation, siégeant aux membres inférieurs (érythromélgies) se traduisant de manière neurologique ou oculaire (accident ischémique transitoire, migraine, diplopie, modification du champ visuel). Induits par les plaquettes ces accidents ischémiques sont très sensibles aux agents antiagrégants. Les thromboses proprement dites, sont typiquement artérielles (cérébrales, coronariennes ou siégeant dans les membres inférieurs) mais des thromboses veineuses sont également régulièrement observées en cours d'évolution. Les hémorragies en revanche, lorsque la maladie est connue et correctement prise en charge ne constituent habituellement qu'un risque très faible. Les données épidémiologiques concernant l'incidence des thromboses sont variables selon les études : l'incidence au diagnostic varie entre 11 et 51 % et durant l'évolution, l'incidence annuelle est de 1,7 % chez les patients < 40 ans et de 15 % chez les patients > 60 ans [Landolfi, 2006]. Différentes études ont pu permettre l'émergence de facteurs de risques thrombotiques, aboutissant à une stratification des populations de patients en fonction du risque vasculaire. Les patients de plus de 60 ans et ayant des antécédents thrombotiques sont considérés à haut risque. Les patients de moins de 40 ans, n'ayant ni antécédents personnels ni familiaux sont considérés à faible risque. Quant aux patients entre 40 et 60 ans ou ayant des facteurs de risque cardiovasculaires (HTA, diabète, hypercholestérolémie...), ils sont considérés à risque intermédiaire. Il faut également noter qu'aucune étude n'a pu établir un lien entre la numération plaquettaire et la survenue de thromboses. A l'inverse, il est admis que les manifestations hémorragiques sont plus fréquentes chez les patients dont la numération plaquettaire dépasse 1000 G/L (par thrombopathie associée).

#### *Prise en charge thérapeutique*

Elle découle largement de l'évaluation du risque vasculaire mais également du caractère symptomatique ou non de la maladie [Référentiel SFH, 2006]. Deux stratégies sont à distinguer dans la prise en charge de la TE :

- obtenir une diminution stable de la numération plaquettaire, en limitant la toxicité. Les traitements cytoréducteurs tels que l'hydroxyurée ont ici fait leur preuve. Des alternatives sont également possibles, comme l'interféron ou l'anagrélide, dérivé de la quinazoline ayant une activité spécifique sur la lignée mégacaryocytaire.
- prévenir la survenue de thrombose : dans ce cas, l'aspirine (antiagrégant plaquettaire) s'est montrée efficace.

## Références

- Brière J, Bellucci S, Abgral JF, Baumelou E, Brière JF, Bryon PA, Cambier N, Cazals-Hatem D, Costello R, Donadio D, Exbrayat C, Hunault-Berger M, Huet B, Praloran V, Sebahoun G, Viallard F. Thrombocytémie essentielle (TE) : nouvelles perspectives diagnostiques et thérapeutiques. *Hématologie*. 2006;12:315-29.
- Briere JB. Essential thrombocythemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:3.
- Cao M, Olsen RJ, Zu Y. Polycythemia vera: new clinicopathologic perspectives. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:1126-32.
- Landolfi R, Cipriani MC, Novarese L. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: pathogenetic mechanisms and prevention. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19:617-33.
- Leone G, Sica S, Chiusolo P, Teofili L, De Stefano V. Blood cells diseases and thrombosis. *Haematologica*. 2001;86:1236-44.
- Référentiel de la Société française d'hématologie. 2006.
- Sanchez S, Ewton A. Essential thrombocythemia: a review of diagnostic and pathologic features. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:1144-50.

## Annexe 2 : Référentiels internationaux des critères diagnostiques de SMP (TE et PV)

### 2001 World Health Organization criteria for polycythemia vera

Diagnosis requires the presence of the first two 'A' criteria together with either any one other 'A' criterion or two 'B' criteria.

#### A-criteria

1. Elevated red cell mass > 25% above mean normal predicted value, or hemoglobin > 18.5 g/dL in men, 16.5 g/dL in women, or > 99<sup>th</sup> percentile of method-specific reference range for age, sex, altitude of residence.
2. No cause of secondary erythrocytosis, including:
  - a. Absence of familial erythrocytosis
  - b. No elevation of erythropoietin due to:
    - i. Hypoxia (arterial pO<sub>2</sub> ≤ 92%)
    - ii. High oxygen affinity haemoglobin
    - iii. Truncated erythropoietin receptor
  - iv. Inappropriate erythropoietin production by tumor
3. Splenomegaly
4. Clonal genetic abnormality other than Philadelphia chromosome or *BCR-ABL* fusion gene in marrow cells
5. Endogenous erythroid colony formation *in vitro*

#### B-criteria

1. Thrombocytosis > 400 x 10<sup>9</sup>/L
2. Leukocytosis > 12 x 10<sup>9</sup>/L
3. Bone marrow biopsy showing panmyelosis with prominent erythroid and megakaryocytic proliferation
4. Low serum erythropoietin levels

### 2001 World Health Organization criteria for essential thrombocythemia

#### Positive Criteria

1. Sustained platelet count ≥ 600 x 10<sup>9</sup>/L
2. Bone marrow biopsy specimen showing proliferation mainly of the megakaryocytic lineage with increased numbers of enlarged, mature megakaryocytes

#### Criteria of exclusion

1. No evidence of polycythemia vera
  - a. Normal red cell mass or hemoglobin < 18.5 g/dL in men, 16.5 g/dL in women
  - b. Stainable iron in marrow, normal serum ferritin or normal MCV
  - c. If the former condition is not met, failure of iron trial to increase red cell mass or Hb levels to the PV range
2. No evidence of chronic myeloid leukemia
  - a. No Philadelphia chromosome and no *BCR-ABL* fusion gene
3. No evidence of chronic idiopathic myelofibrosis
  - a. Collagen fibrosis absent
  - b. Reticulin fibrosis minimal or absent
4. No evidence of myelodysplastic syndrome
  - a. No del(5q), t(3;3)(q21;q26), inv(3)(q21q26)
  - b. No significant granulocytic dysplasia, few if any micromegakaryocytes
5. No evidence that thrombocytosis is reactive due to:
  - a. Underlying inflammation or infection
  - b. Underlying neoplasm
  - c. Prior splenectomy

## Polycythemia Vera (PCV) Study Group Diagnostic

Diagnosis of PCV is established with all major criteria or first 2 major criteria plus any 2 minor criteria.

### Major criteria

1. Total red blood cell mass — In males,  $\geq 36$  mL/kg; in females,  $\geq 32$  mL/kg
2. Arterial oxygen saturation  $\geq 92\%$
3. Splenomegaly

### Minor criteria

1. Thrombocytosis with platelet count  $> 400\,000/\mu\text{L}$
2. Leukocytosis with a white blood cell count  $> 12\,000/\mu\text{L}$
3. Increased leukocyte alkaline phosphatase  $> 100$  U/L
4. Serum vitamin B12 concentration greater than 900 pg/mL or binding capacity  $> 2200$  pg/mL

## Proposed revised World Health Organization criteria for polycythemia vera (Tefferi, Blood, 2007)

Diagnosis requires the presence of both major criteria and one minor criterion or the presence of the first major criterion together with two minor criteria.\*\*

### Major criteria

1. Hemoglobin  $> 18.5$  g/dL in men, 16.5 g/dL in women **or** other evidence of increased red cell volume\*
2. Presence of *JAK2V617F* or other functionally similar mutation such as *JAK2* exon 12 mutation

### Minor criteria

1. Bone marrow biopsy showing hypercellularity for age with trilineage growth (panmyelosis) with prominent erythroid, granulocytic, and megakaryocytic proliferation
2. Serum erythropoietin level below the reference range for normal
3. Endogenous erythroid colony formation *in vitro*

\*Hemoglobin or hematocrit  $> 99^{\text{th}}$  percentile of method-specific reference range for age, sex, altitude of residence **or** Hemoglobin  $> 17$  g/dL in men, 15 g/dL in women if associated with a documented and sustained increase of at least 2 g/dL from an individual's baseline value that can not be attributed to correction of iron deficiency, **or** Elevated red cell mass  $> 25\%$  above mean normal predicted value

## Proposed revised World Health Organization (WHO) criteria for essential thrombocythemia (ET) (Tefferi, Blood, 2007)

Diagnosis requires meeting all four criteria.

1. Sustained<sup>a</sup> platelet count  $\geq 450 \times 10^9/\text{L}$
2. Bone marrow biopsy specimen showing proliferation mainly of the megakaryocytic lineage with increased numbers of enlarged, mature megakaryocytes. No significant increase or left-shift of neutrophil granulopoiesis or erythropoiesis
3. Not meeting WHO criteria for polycythemia vera,<sup>b</sup> primary myelofibrosis,<sup>c</sup> chronic myelogenous leukemia,<sup>d</sup> myelodysplastic syndrome,<sup>e</sup> or other myeloid neoplasm
4. Demonstration of *JAK2V617F* or other clonal marker, **or** in the absence of a clonal marker, no evidence for reactive thrombocytosis<sup>f</sup>

a. During the work-up period.

b. Requires the failure of iron replacement therapy to increase hemoglobin level to the polycythemia vera range in the presence of decreased serum ferritin. Exclusion of polycythemia vera is based on hemoglobin and hematocrit levels and red cell mass measurement is not required.

c. Requires the absence of relevant reticulin fibrosis, collagen fibrosis, peripheral blood leukoerythroblastosis, or markedly hypercellular marrow for age accompanied by megakaryocyte morphology that is typical for primary myelofibrosis – small to large with an aberrant nuclear/cytoplasmic ratio and hyperchromatic, bulbous or irregularly folded nuclei and dense clustering

d. Requires the absence of BCR-ABL

e. Requires absence of dyserythropoiesis and dysgranulopoiesis

f. Causes of reactive thrombocytosis include iron deficiency, splenectomy, surgery, infection, inflammation, connective tissue disease, metastatic cancer, and lymphoproliferative disorders. However, the presence of a condition associated with reactive thrombocytosis does not exclude the possibility of ET if the first three criteria are met.



**Annexe 3 : Fiche de renseignement patient**

**Etude**

**« Evaluation de la contribution des leucocytes dans la  
thrombogenèse au cours des syndromes  
myéloprolifératifs »  
(Maladie de Vaquez et Thrombocytemie essentielle)**

Médecin référent :

**Patient :**

**Date de naissance :**

**N° inclusion :**

**Diagnostic :**

**TE** ☐

**PV** ☐

**Date du diagnostic :**

Posé selon les critères : **PVSG** ☐

**OMS (2001)** ☐

**OMS (2007)** ☐

**1- Facteurs de risque cardiovasculaire :**

**Tabac** ☐ .....paquets.année

**Hyperlipidémie** ☐

**HTA** ☐

**Obésité** ☐

**Diabète sucré** ☐

**ATCD familiaux cardiovasculaires** ☐

**2- Antécédents :**

▪ **Accident hémorragique** : O ☐ N ☐ Année(s) :

Précisez : .....  
.....

▪ **Accident thrombotique** : O ☐ N ☐

-Artériel ☐ Année(s) :

Précisez : .....  
.....

-Veineux ☐ Année(s) :

Précisez : .....  
.....

▪ **Pathologie ischémique** : O ☐ N ☐ Année(s) :

Précisez : .....  
.....

### 3- Au diagnostic

▪ Hb = .....g/dL                      Ht = .....%                      Plaquettes = .....G/L

Leucocytes = .....G/L                      Dont PN = .....G/L

▪ Culture progéniteurs :                      O ☐                      N ☐

- Pousse spontanée BFU:                      O ☐                      N ☐

- Pousse spontanée MK :                      O ☐                      N ☐

▪ JAK<sub>2</sub><sup>V617F</sup>                      absence ☐                      hétérozygote ☐                      homozygote ☐                      non recherché ☐

▪ Cytogénétique :

### 4- Lors de l'étude

Date :

▪ Hb = .....g/dL                      Ht = .....%                      Plaquettes = .....G/L

Leucocytes = .....G/L                      Dont PN = .....G/L

▪ PCR = .....mg/L                      Fg = ..... g/L

### 5- Traitement en cours :

Aucun                      ☐

Saignées                      ☐

HU                      ☐

Pipobroman                      ☐

INF alpha                      ☐

Anagrélide                      ☐

Aspirine                      ☐

Autre inhib. fonctionnel plaquettaire ☐

précisez : .....

### Traitements antérieurs :

Aucun                      ☐

Saignées                      ☐

HU                      ☐

Pipobroman                      ☐

INF alpha                      ☐

Radiophosphore P<sup>32</sup> ☐

Anagrélide                      ☐

Aspirine                      ☐

Autre inhib. fonctionnel plaquettaire ☐

précisez : .....



# ETUDE DE L'IMPACT DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES ET DE DEUX ENZYMES DERIVEES, CATHEPSINE G ET ELASTASE SUR LA COAGULATION

EA 3452 – Faculté de Pharmacie

---

## Résumé

---

Les polynucléaires neutrophiles (PN) sont les éléments cellulaires nucléés les plus abondants dans le sang circulant. Leur implication dans l'hémostase - en particulier dans la coagulation et la constitution du caillot - n'est pas un concept nouveau, mais requière encore beaucoup d'éclaircissements. De nombreuses données sont rapportées dans la littérature, attribuant à ces cellules à la fois une capacité à favoriser la coagulation (voire à la déclencher) et une capacité à limiter voire éliminer le caillot de fibrine. Parmi les mécanismes évoqués pour expliquer leur implication, une contribution des nombreuses enzymes contenues dans leurs granulations, et essentiellement la cathepsine G (Cath G) et l'élastase (HNE), est fréquemment citée. L'objet de ces travaux est dans un premier temps d'étudier chez des sujets sains l'impact des PN humains et des 2 enzymes granulocytaires (Cathepsine G et élastase) sur la coagulation, à l'aide de tests globaux : thromboélastométrie rotative (ROTEM®) et test de génération de thrombine (thrombinographie – CAT®). Dans un second temps, le potentiel procoagulant des PN a été étudié en thrombinographie chez des patients atteints de syndrome myéloprolifératif (SMP) JAK2<sup>V617F</sup> positif. Dans les systèmes choisis, les PN font preuve d'une activité procoagulante claire, permettant notamment une réduction systématique du temps de coagulation et une augmentation du travail thrombinique total. Cette activité procoagulante est proportionnelle à la concentration en PN et est exacerbée après stimulation préalable des cellules par le fMLP, mais elle n'est pas liée à une activité facteur tissulaire. La Cath G et l'HNE permettent également toutes deux une réduction du temps de coagulation, mais elles font preuve à la fois d'effets procoagulants (par inactivation des inhibiteurs comme le TFPI) et anticoagulants (par inactivation du facteur V ou par dégradation de la (du) fibrin(ogène)). Enfin, les données de ce travail ne mettent pas en évidence une hypercoagulabilité liée aux PN dans le contexte de SMP.

**Mots-clé :** Polynucléaires neutrophiles, Cathepsine G, Elastase, Thromboélastométrie rotative, Thrombinographie, Syndromes myéloprolifératifs

---

## Summary

---

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are the most abundant nucleated cells in blood. Their involvement in haemostasis – in particular in coagulation and clot formation – is not a new concept, but is not yet fully understood. Many data from the literature indicate that these cells can enhance (even trigger) coagulation, whereas others indicate it can impair fibrin formation and facilitate clot elimination. Among the hypotheses explaining this involvement, attention has focused on PMN granules enzymes, in particular, Cathepsin G (Cath G) and elastase (HNE). We first aim at studying in healthy subjects the impact of PMN as well as Cath G and HNE on coagulation by use of global tests: rotative thromboelastometry (ROTEM®) and thrombin generation test (CAT®). Second, procoagulant potential of PMN is investigated using CAT® in patients affected by myeloproliferative disorders (MPD), with presence of JAK2<sup>V617F</sup> mutation. Under our conditions, PMN show an unambiguous procoagulant activity, inducing systematically a decrease in clotting time, along with an increase in total thrombin work. This activity is proportional with PMN concentration; fMLP-induced PMN stimulation enhances also it, but this is not related to tissue factor activity. Both Cath G and HNE induce a decrease in clotting time, but support procoagulant (by inactivation of inhibitors such as TFPI) as well as anticoagulant activity (by inactivation of factor V or fibrin(ogen) degradation). At last, data obtained don't show MPD-associated hypercoagulability which can be attributed to PMN.

**Keywords:** Polymorphonuclear neutrophils, Cathepsin G, Elastase, Rotative thromboelastometry, Thrombography, Myeloproliferative disorders