



HAL
open science

Mécanismes vasculaires et thrombotiques dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Celia Schellenberg

► **To cite this version:**

Celia Schellenberg. Mécanismes vasculaires et thrombotiques dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0277 . tel-04094766

HAL Id: tel-04094766

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04094766>

Submitted on 11 May 2023

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.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

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 bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Célia SCHELLENBERG**

Mécanismes vasculaires et thrombotiques dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Vendredi 16 décembre 2022

Membres du jury :

Rapporteurs :	Sophie Susen	PU-PH, CHU Lille, INSERM U1011, Université de Lille
	Laurent Dubuquoy	DR, INSERM U1286, Université de Lille
Présidente du Jury :	Rosa Maria Rodriguez-Guéant	PU-PH, CHRU Nancy, INSERM U1256, Université de Lorraine
Examineurs :	Pierre Mangin	DR2, INSERM U1255, Université de Strasbourg
	Patrick Lacolley	DR1, INSERM U1116, Université de Lorraine, Nancy - directeur de thèse
	Laurent Peyrin-Biroulet	PU-PH, CHRU Nancy, INSERM U1256, Université de Lorraine, Nancy - co-directeur de thèse

C'est une folie de haïr toutes les roses parce qu'une épine vous a piqué, d'abandonner tous les rêves parce que l'un d'entre eux ne s'est pas réalisé, de renoncer à toutes les tentatives parce qu'on a échoué... C'est une folie de condamner toutes les amitiés parce qu'une d'elles vous a trahi, de ne croire plus en l'amour juste parce qu'un d'entre eux a été infidèle, de jeter toutes les chances d'être heureux juste parce que quelque chose n'est pas allé dans la bonne direction. Il y aura toujours une autre occasion, un autre ami, un autre amour, une force nouvelle. Pour chaque fin il y a toujours un nouveau départ.

Antoine Saint-Exupéry, le petit Prince

Remerciements

A partir du moment où l'on se met à écrire les remerciements c'est que l'on voit le bout du tunnel. Les remerciements c'est un peu la partie facile du manuscrit.

Le premier remerciement revient au **Dr. Patrick Lacolley**, directeur de l'unité Inserm 1116 mais également mon directeur de thèse. Merci de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir aidé à mener à bien cette thèse grâce à vos conseils, vos corrections et votre savoir dans le domaine cardiovasculaire.

Je tiens à remercier le **Pr. Laurent Peyrin-Biroulet**, mon co-directeur de thèse. Merci de m'avoir fourni une cohorte de patients pour mon sujet de thèse. Tout au long de ma thèse, vous m'avez enseigné votre savoir sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Je remercie le **Dr. Véronique Regnault**, responsable de l'équipe 1 du laboratoire. Merci de m'avoir transmis votre savoir sur la génération de thrombine. C'était un plaisir de se retrouver dans la même pièce lors des expériences et d'échanger et de rigoler ensemble.

Je remercie le **Dr. Jérémy Lagrange**, de m'avoir supporté pendant 3 ans, de m'avoir partagé son savoir et ses astuces. D'avoir toujours été là quand j'en avais besoin, d'avoir corrigé mes travaux, parfois en faisant la grimace en me relisant ! Merci pour le soutien et la bonne humeur, je pense que sans lui cette thèse aurait été plus compliquée.

Je remercie le **Dr. Cécile Denis** et le **Dr. Peter Lenting** pour leur implication dans mon projet de thèse. Merci pour les discussions scientifiques très enrichissantes lors de vos venues à Nancy pour faire avancer mon projet.

Je tiens à remercier le **Dr. Marianne Parent**, membre de mon comité de suivi de thèse. Merci pour votre écoute et vos conseils lors des 2 comités.

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse :

Le **Pr. Sophie Susen**, pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse et plus particulièrement la partie coagulation. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma plus profonde gratitude.

Le **Pr. Laurent Dubuquoy**, pour avoir accepté de juger mon travail de thèse et plus particulièrement la partie sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Le **Pr. Rosa Maria Rodriguez-Guéant**, pour l'honneur d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Le **Dr. Pierre Mangin**, pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour votre écoute et vos conseils lors des 2 comités.

Je remercie le **Dr. Julien Perrin** pour son expertise de l'hématologie. Merci pour nos séances au microscope qui m'ont bien aidée. Merci pour sa disponibilité et sa bonne humeur.

Je remercie le **Pr. François Plénat** pour son expertise en histologie. Merci pour vos conseils et votre aide pour toute la partie histologie de mon projet de thèse.

Je tiens à remercier « la secte » (**Dr. Huguette Louis** alias Oscar, **Cécile Lakomy** alias Maurice et le **Dr. Simon Toupance**). Merci de m'avoir intégrée à votre « secte ». Ce fut un plaisir de partager avec vous le café du matin et tous ces moments de rire tout au long de cette thèse. En nourrissant Oscar et Maurice le matin je penserai à vous. Je ne vous oublierai pas. Trêve de plaisanterie, je vous remercie également pour votre aide scientifique et votre savoir (cytométrie en flux, thrombinographie et statistiques).

Je remercie le **Dr. Zhor Ramdane-Cherif** pour son aide en informatique mais surtout pour sa bonne humeur et pour son rire qu'on entend à l'autre bout du couloir.

Je remercie le **Dr. Nathalie Mercier** pour son aide technique sur la réglementation animale, de m'avoir aidée quand c'était nécessaire et pour sa bonne humeur.

Je remercie le **Dr. Rumeyza Bascetin** pour sa bonne humeur, les discussions très enrichissantes que nous avons pu avoir ensemble le midi et pour ses conseils en microscopie.

Je remercie le **Dr. Zhenlin Li** qui a toujours été disponible quand j'avais des questions sur le génotypage des souris et sur la gestion de lignées.

Je tiens à remercier le **Dr. Simon Thornton** pour sa bonne humeur, son savoir et je lui souhaite une agréable retraite.

Je remercie le **Dr. Frances Yen Potin** pour sa bonne humeur.

Merci à mes deux collègues de bureau, **Cindy Lerognon** et **Brandon Clerc**, pour leur bonne humeur et leur soutien. Je m'excuse d'avoir grogner et parler toute seule durant ma rédaction de thèse. Merci d'avoir supporté cela au quotidien.

Merci aux nouveaux docteurs (**Dr. Manon Durand** et **Dr. Matthieu Bardin**). Ce fut un plaisir d'avoir partagé cette thèse avec vous, d'avoir pu assister à votre soutenance de thèse. Et merci pour votre bonne humeur.

Merci aux futurs docteurs : **Eugénie** : merci pour ces discussions Netflix et plantes le midi.

Enzo : merci pour ces discussions où on pouvait refaire le monde. **Mohammad** : j'ai été contente de partager un congrès avec toi et désolé pour le coup de soleil que tu as eu à Biarritz. Bon courage à vous pour votre fin de thèse. **Sara**, bon courage pour ces trois années de thèse qui t'attendent.

Merci au postdoctorant le **Dr. Usman Ahmed** pour son aide dans les expériences et pour les quelques conversations que nous avons pu avoir car cela m'a fait un peu travailler mon anglais.

Merci à **Véronique Laplace** pour s'être occupée de mes souris au quotidien.

Merci au **Dr. Thomas Foret** pour sa bonne humeur lors de son stage de Master 2 au sein du laboratoire. Je lui souhaite bon courage pour sa thèse en sciences.

Merci au futur **Dr. Sénadé Atsou**. Merci pour cette collaboration et bon courage pour la fin de thèse. Je remercie également son directeur de thèse le **Dr. Olivier Christophe** pour son aide et sa bienveillance.

Je tiens à remercier **Audrey Isch**. Aujourd'hui je ne vais pas la remercier en tant que secrétaire du laboratoire mais plutôt en tant qu'amie. Merci d'avoir été là pour moi. Merci pour ta bonne humeur, ta bienveillance et pour nos discussions autour de l'Alsace.

Merci à la team « Caca » (**Dr. Djésia Arnone**, **Dr. Anne-Charlotte Heba** et **Myriam**). Merci les filles pour votre aide et votre bonne humeur.

Merci aux membres de l'équipe AD'UL TEAM : le futur **Dr. Karim Matmat** ainsi qu'au futur **Dr. Youssef Sibli**. C'était vraiment sympa de faire partie de l'association avec vous, d'avoir partagé des sorties et des midis croq'ensemble.

Un merci tout particulier au futur **Dr. Pauline Dimofski** qui d'abord était la simple trésorière de l'association et qui par la suite est devenue une véritable amie et un véritable soutien au quotidien. Merci pour ces milliers de sms et vocaux échangés, pour ces sorties et ces fous rires. Bon courage pour le poste d'ATER et pour la fin de thèse.

Merci à **Allyson Hollander**, ancienne collègue et maintenant amie pour son soutien.

Merci à mon amie le **Dr. Mary Tannoo** de me soutenir depuis mon stage de Master 2.

Je remercie le **Dr. Alexandre Raoul** pour toute cette folie partagée. Son énergie débordante n'a pas toujours été de tout repos. Merci pour toutes les aventures traversées durant ces 3

années. Si je devais retenir une chose c'est que le temps passe à toute vitesse et qu'on n'a pas le temps.

Je remercie mes supers amis **Lola**, **Hélène**, et **Guillaume**. Merci de m'avoir accompagnée et de m'avoir soutenue moralement durant ces 3 années. Je vous aime les gars.

Merci à mon meilleur ami **Nicolas** depuis presque 10 ans. Je le remercie pour son soutien sans faille. Merci pour toutes les relectures qu'il a effectuées pour corriger mes fautes d'orthographe. Merci d'avoir toujours été là quand j'avais besoin de calcul de dilution.

Je remercie mon copain. Merci pour sa tolérance durant ces 3 années. Les allers-retours Strasbourg-Nancy n'ont pas toujours été faciles. Les relations à distances ne sont pas simples mais nous y sommes arrivés.

Et pour finir,

Le plus grand des mercis revient à ma famille. Merci d'avoir cru en moi. Merci à mes parents, c'est grâce à eux que je suis qui je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même. Merci à ma sœur Inès pour son soutien.

C'est avec joie et émotion que je dédie cette thèse à mes grands-parents et à mes parents.

Liste des communications et publications

Publications

REGNAULT Véronique, RAOUL Alexandre, **SCHELLENBERG Célia**, et al. Smooth muscle cell molecular underpinnings of vascular ageing. Heart, Lung and Circulation, 2021, vol. 30, no 11, p. 1595-1598.

LAGRANGE Jérémy, **SCHELLENBERG Célia**. Implication des protéines de l'hémostase dans la physiopathologie de la paroi vasculaire : exemple du facteur von Willebrand. Volume 3 - Numéro 2 - Avril-Juin 2021. Revue Francophone d'Hémostase et de Thrombose 2021 ; 3 (2) : 101-7.

SCHELLENBERG Célia, REGNAULT Véronique, PEYRIN-BIROULET Laurent, LACOLLEY Patrick, LAGRANGE Jérémy. Mécanismes moléculaires thrombotiques au cours des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). Revue acceptée pour publication dans le journal d'Hépatogastro & Oncologie Digestive

SCHELLENBERG Célia, LAGRANGE Jérémy, AHMED Muhammad Usman, CAMPOLI Philippe, LOUIS Huguette, CARON Bénédicte, PLENAT François, PERRIN Julien, LENTING Peter, DENIS Cécile, PEYRIN-BIROULET Laurent, REGNAULT Véronique, LACOLLEY Patrick. Differential implication of platelets and von Willebrand factor in inflammatory bowel disease-dependent procoagulant and disease phenotypes. Article en cours de rédaction

SCHELLENBERG Célia, ATSOU Sénadé, LAGRANGE Jérémy, LACOLLEY Patrick, LENTING Peter, DENIS Cécile, CHRISTOPHE Olivier, REGNAULT Véronique. A potential thrombotic angiopathy is observed in FVIII deficient plasma when aPCC was added to Emicizumab in an in vitro approach. Article en cours de rédaction

Présentations affichées en congrès

SHELLENBERG Célia, LAGRANGE Jérémy, LAKOMY Cécile, LOUIS Huguette, LACOLLEY Patrick, PEYRIN-BIROULET Laurent, REGNAULT Véronique. Exploration of the vascular immunothrombosis in inflammatory bowel disease. *GRRC 2020 (Congrès en ligne)*.

SHELLENBERG Célia, REGNAULT Véronique, DENIS Cécile, LENTING Peter, LACOLLEY Patrick, PEYRIN-BIROULET Laurent, LAGRANGE Jérémy. Platelets and von Willebrand factor implication in pro-coagulant state in inflammatory bowel disease. *NSFA Biarritz 2022*.

SHELLENBERG Célia, REGNAULT Véronique, DENIS Cécile, LENTING Peter, LACOLLEY Patrick, PEYRIN-BIROULET Laurent, LAGRANGE Jérémy. Platelets and von Willebrand factor implication in pro-coagulant state in inflammatory bowel disease. *Rencontres de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de L'innovation en Grand Est Metz 2022*

SHELLENBERG Célia, REGNAULT Véronique, DENIS Cécile, LENTING Peter, LACOLLEY Patrick, PEYRIN-BIROULET Laurent, LAGRANGE Jérémy. Platelets and von Willebrand factor implication in pro-coagulant state in inflammatory bowel disease. *ARTERY Nancy 2022*.

Sommaire

Liste des figures	5
Liste des tableaux	8
Liste des abréviations.....	9
PARTIE 1 : INTRODUCTION	11
1. <i>Les maladies cardiovasculaires</i>	<i>12</i>
2. <i>Le vieillissement vasculaire.....</i>	<i>13</i>
3. <i>Inflammation</i>	<i>19</i>
3.1 Inflammation locale.....	19
3.2 Inflammation systémique	19
4. <i>Hémostase et thrombose.....</i>	<i>21</i>
4.1 L'hémostase primaire	21
4.2 La plaquette sanguine.....	22
4.3 Le facteur von Willebrand.....	24
4.4 La coagulation	33
4.5 La fibrinolyse	33
4.6 La thrombose.....	34
5. <i>Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....</i>	<i>40</i>
5.1 La maladie de Crohn	40
5.2 La rectocolite hémorragique.....	40
5.3 Prise en charge et traitements.....	41
5.4 Physiopathologie	42
5.5 Risque de thrombose dans les MICI.....	44
6. <i>Modèles animaux de MICI.....</i>	<i>54</i>
PARTIE 2 : HYPOTHESES & OBJECTIFS.....	56

PARTIE 3 : MATERIELS & METHODES 59

1. Étude clinique : Identification de biomarqueurs pronostiques de l'histoire naturelle et prédictifs de la réponse aux biothérapies au cours des maladies inflammatoires chroniques intestinales (I-BANK)	60
1.1 Spécimens biologiques	60
1.2 Thrombinographie	61
1.3 Frottis sanguin	63
1.4 Immunohistochimie.....	63
2. Expérimentation animale	64
2.1 Bien-être animal	64
2.2 Induction de la colite expérimentale	64
2.3 Souris VWF KO	64
2.4 Score inflammatoire	65
2.5 Prélèvement et préparation des échantillons biologiques.....	65
2.6 Étude histologique du colon.....	66
3. Mesure de l'activation de plaquettes de souris par immunofluorescence	67
4. Dosage de la lipocaline fécale	68
5. Dosage par test ELISA	68
5.1 Dosage du VWF : Ag chez les patients MICI et chez la souris	68
5.2 Dosage du VWF actif chez les patients MICI.....	68
5.3 Dosage des D-Dimères chez les patients MICI.....	69
5.4 Dosage du TFPI total chez les patients MICI.....	69
5.5 Dosage du complexe ADN-Myéloperoxydase (MPO) pour le dosage des NETS chez la souris	69
5.6 Dosage du complexe ADN-Histone pour le dosage des NETS chez la souris.....	70
6. Cytométrie en flux sur du sang de souris	70
6.1 Activation des plaquettes en sang total	70
6.2 Quantification des plaquettes procoagulantes en sang total.....	71
7. Analyses statistiques.....	71

PARTIE 4 : RESULTATS..... 72

1. Étude I-BANK.....	73
----------------------	----

1.1	Génération de thrombine en plasma riche et pauvre en plaquettes chez les patients MICI de la cohorte I-BANK	74
1.2	Agglutination plaquettaire chez les patients de la cohorte I-BANK	76
1.3	Dosage plasmatique du facteur VWF chez les patients de la cohorte I-BANK...	78
1.4	Dosage plasmatique des D-Dimères chez les patients de la cohorte I-BANK.....	78
1.5	Dosage plasmatique du TFPI total chez les patients de la cohorte I-BANK	79
2.	<i>Caractérisation de la coagulation chez des souris traitées au DSS</i>	80
2.1	Évolution de la sévérité de la colite chez la souris.....	80
2.2	Génération de thrombine chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS.....	83
2.3	Activation plaquettaire en sang total chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS.....	85
2.4	Évaluation de l'exposition de PS, de P-selectine et d'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface des plaquettes par cytométrie en flux	86
2.5	Capacité des plaquettes à adhérer après activation	87
2.6	Agglutination plaquettaire chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS	89
2.7	Dosage plasmatique du facteur VWF chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS.....	90
2.8	Dosage plasmatique des complexes ADN-MPO et ADN-Histone chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS	91
3.	<i>Étude de la coagulation chez des souris contrôles et VWF KO traitées ou non par du DSS</i>	92
3.1	Évolution de la sévérité de la colite chez des souris VWF KO traitées au DSS ..	93
3.2	Amas plaquettaires chez des souris contrôles traitées au DSS et des souris VWF KO traitées au DSS.....	94
3.3	Génération de thrombine chez des souris contrôles traitées au DSS et VWF KO traitées au DSS	96
3.4	Dosage plasmatique des complexes ADN-MPO et ADN-Histone chez des souris contrôles traitées au DSS et VWF KO traitées au DSS	98
3.5	Sévérité de la colite chez des souris VWF KO traitées au DSS.....	98
PARTIE 5 : DISCUSSION		101

PARTIE 6 : ANNEXE..... 112

PARTIE 7 : BIBLIOGRAPHIE..... 164

Liste des figures

Figure 1 : Composition de la paroi artérielle (Blausen S. et coll., 2014).....	13
Figure 2 : Représentation de l'hémostase primaire et des différentes étapes de l'activation des plaquettes (La filière des maladies hémorragiques constitutionnelles MHEMO https://mhemofr/).....	21
Figure 3 : Représentation schématique d'une plaquette avec son contenu et ses différents récepteurs.....	24
Figure 4 : Schéma de la cascade de coagulation (La filière des maladies hémorragiques constitutionnelles MHEMO https://mhemofr/)	34
Figure 5 : Schéma de la triade de Virchow	35
Figure 6 : Schéma d'une thrombose artérielle et d'une thrombose veineuse d'après Mackman, Nature 2008	37
Figure 7 : Schéma de l'immuno-thrombose	38
Figure 8 : Atteinte de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique.....	41
Figure 9 : Comparaison d'un microbiote normal et d'un microbiote de MICI d'après Peterson et al.2008 ⁶⁴	43
Figure 10 : Schéma des paramètres mesurés et calculés lors de l'analyse de la génération de thrombine	61
Figure 11 : Technique étalement frottis sanguin (SVT académie de Versailles).....	63
Figure 12 : Frottis sanguin après fixation au méthanol et coloration MGG.....	63
Figure 13 : Génération de thrombine en plasma riche en plaquettes chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK	75
Figure 14 : Génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK	76
Figure 15 : Photos de frottis sanguin de sujets contrôles et de patients de la cohorte I-BANK après coloration au MGG	77
Figure 16 : Quantification des amas plaquettaires chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK	77
Figure 17 : Dosage du VWF total et du VWF actif chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK.....	78

Figure 18 : Dosage des D-Dimères chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK.....	79
Figure 19 : Dosage du TFPI total chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK.....	79
Figure 20 : Suivi quotidien chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS.....	81
Figure 21 : Dosage de la lipocaline chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS...	81
Figure 22 : Coupes de colon d'une souris contrôle et d'une souris traitée au DSS après coloration HES	82
Figure 23 : Génération de thrombine chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS sur plasma riche en plaquettes.....	84
Figure 24 : Génération de thrombine chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS sur plasma pauvre en plaquettes.....	85
Figure 25 : Analyse de l'activation plaquettaire en sang total par cytométrie en flux chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS	86
Figure 26 : Analyse par cytométrie en flux de l'activité procoagulante et de l'état d'activation des plaquettes chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS	87
Figure 27 : Photos de plaquettes après activation chez une souris contrôle et chez une souris traitée au DSS.....	88
Figure 28 : Quantification du nombre de plaquettes adhérentes par mm ² après activation chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS	89
Figure 29 : Frottis sanguin chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS	90
Figure 30 : Dosage du facteur VWF chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS .	91
Figure 31 : Dosages des complexes ADN-MPO et ADN-Histone chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS	91
Figure 32 : DAI chez des souris contrôles traitées au DSS et des souris VWF KO traitées au DSS.....	93
Figure 33 : Dosage de la lipocaline dans du lysat de colon chez la souris contrôle et la souris VWF KO traitée ou non au DSS	94
Figure 34 : Frottis sanguin de souris contrôles avec et sans DSS et de souris VWF KO avec ou sans DSS.....	95
Figure 35 : Quantification des amas plaquettaires chez des souris contrôles traitées au DSS et VWF KO traitées au DSS.....	96
Figure 36 : Génération de thrombine dans le plasma riche en plaquettes de souris contrôles traitées au DSS et des souris KO VWF traitées au DSS	97

Figure 37 : Dosage des complexes ADN-MPO et ADN-Histone chez des souris contrôles traitées au DSS et des souris VWF KO traitées au DSS	98
Figure 38 : Coupe de colon chez la souris contrôle traitée au DSS et la souris VWF KO traitée au DSS.....	99
Figure 39 : Pourcentage de sévérité de la colite chez des souris contrôles traitées au DSS et des souris VWF KO traitées au DSS.....	99

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les récepteurs membranaires des plaquettes d'après Yu et al. 2012 et Zlamal et al. 2018.....	23
Tableau 2 : Exemples de modèles disponibles pour étudier les MICI chez la souris	55
Tableau 3 : Scores permettant de calculer le DAI chez la souris d'après Murthy et al.1993 ..	65
Tableau 4 : Score histologique de Nancy avec ses huit critères et le score associé d'après Marchal et al. 2015.....	67
Tableau 5 : Caractéristiques cliniques des patients de la cohorte I-BANK	73
Tableau 6 : Numération sanguine chez les patients de la cohorte I-BANK.....	74
Tableau 7 : Numération sanguine chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS	80
Tableau 8 : Analyse faite par l'anatomopathologiste des coupes HES de colon selon l'index histologique de Nancy (lecture en l'aveugle).....	83
Tableau 9 : Numération sanguine chez des souris contrôles, contrôles traitées au DSS, VWF KO et VWF KO traitées au DSS	92
Tableau 10 : Analyse faite par l'anatomopathologiste des coupes HES de colon selon l'index histologique de Nancy (lecture en l'aveugle).....	100
Tableau 11 : Liste de maladies avec présence de facteur VWF actif.....	106

Liste des abréviations

- 5-ASA : Acide 5-aminosalicylique
- ADAMTS13 : « a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13 »
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADP : Adénosine 5' diphosphate
- ATP : Adénosine triphosphate
- BSA : Albumine de sérum bovin
- CE : Cellule endothéliale
- CHRU : Centre hospitalier régional universitaire
- CMLV : Cellule musculaire lisse vasculaire
- CPP : Comité de protection des personnes
- CTAD : Citrate, Théophylline, Adénosine, Dipridamole
- CRB : Centre de ressources biologiques
- DAI : « Disease activity index »
- DAMP : Motifs moléculaires associés aux dommages
- DSS : Sulfate de Dextran Sodique
- EDTA : Ethylène diamine tétraacétique
- ETP : Potentiel endogène de thrombine
- FII : Prothrombine
- FIIa : Thrombine
- FT : Facteur tissulaire
- GP : Glycoprotéine
- GPRP : Gly-Pro-Arg-Pro
- GSAO : acide 4-(N-((S-glutathionyl) acétyl) amino)benzoïque
- HBSS : Solution saline équilibrée de Hank
- HES : Hématoxyline, éosine et safran
- IBANK : Identification de biomarqueurs pronostiques de l'histoire naturelle et prédictifs de la réponse aux biothérapies au cours des maladies inflammatoires chroniques intestinales
- INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale
- JAK : Janus Kinase
- KO : Knock Out
- LCN-2 : Lipocaline 2
- LRP4 : Protéine 4 liée aux récepteurs des lipoprotéines de basse densité
- MC : Maladie de Crohn
- MESRI : Ministère de l'enseignement supérieur de la recherche et de l'innovation

MGG : May-Grünwald Giemsa
MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MPO : Myéloperoxydase
NETs : Pièges extracellulaires des neutrophiles
NOD2 : « Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2 »
PAD4 : Protéine-arginine déiminase de type 4
PAI : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PAMP : Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes
PBS : Tampon phosphate salin
PC : Phosphatidylcholine
PCa : Protéine C activée
PE : Phosphatidyléthanolamine
PFA : Paraformaldéhyde
PPP : Plasma pauvre en plaquette
PRP : Plasma riche en plaquette
PS : Phosphatidylsérine
PTT : Purpura thrombocytopénique thrombotique
RCH : Rectocolite hémorragique
SEM : Erreur standard de moyenne
TBST : Solution saline tamponnée au Tris + tween-20
TFPI : Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNBS : Acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique
TNF : Facteur de nécrose tumorale
t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène
TRAP-6 : Peptide 6 activateur du récepteur de la thrombine
UMR : Unité mixte de recherche
u-PA : Activateur du plasminogène de type urokinase
VGM : Volume globulaire moyen
VP : Vésicule phospholipidique
VPM : Volume plaquettaire moyen
VWF : Facteur von Willebrand

PARTIE 1 : INTRODUCTION

1. Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité avec plus de 18 millions de personnes décédées dans le monde par an ¹. Les crises cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux seraient à eux seuls responsables de 4/5^{ème} de ces décès. Un tiers de ces décès concerne des personnes de moins de 70 ans. En France, les maladies cardiovasculaires sont la 2^{ème} cause de mortalité après les cancers avec plus de 140 000 décès par an. Les maladies cardiovasculaires touchent le cœur et l'ensemble des vaisseaux sanguins avec comme conséquences le développement de pathologies telles que l'athérosclérose, les troubles du rythme cardiaque, l'insuffisance cardiaque, les infarctus du myocarde ou cérébraux ou encore d'autres types de thromboses.

Le diabète de type 2, les troubles métaboliques (cholestérol), le tabagisme, les mauvaises habitudes alimentaires, l'alcool ou encore un mode de vie de plus en plus sédentaire contribuent à l'augmentation de la survenue de maladies cardiovasculaires ².

D'autres facteurs peuvent entrer en jeu et augmenter le risque cardiovasculaire comme les maladies inflammatoires ³. L'augmentation du risque cardiovasculaire est déjà bien établie dans des pathologies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ^{4,5}. Dans ces maladies inflammatoires, le risque de thrombose est augmenté. En parallèle des facteurs de risques classiques, d'autres facteurs sont responsables d'une augmentation du risque cardiovasculaire tels que la dysfonction endothéliale, l'hypercoagulabilité ou encore l'inflammation ^{6,7,8}.

2. Le vieillissement vasculaire

Le système cardiovasculaire permet au sang de circuler dans tout le corps pour transporter les nutriments et l'oxygène. Ce système est composé du cœur, des artères, des veines, des artérioles et des capillaires. L'aorte est l'artère principale du corps et, comme tous les autres vaisseaux de la macrocirculation, est organisée en trois feuillets différents (*figure 1*) :

- Intima,
- Média
- Adventice

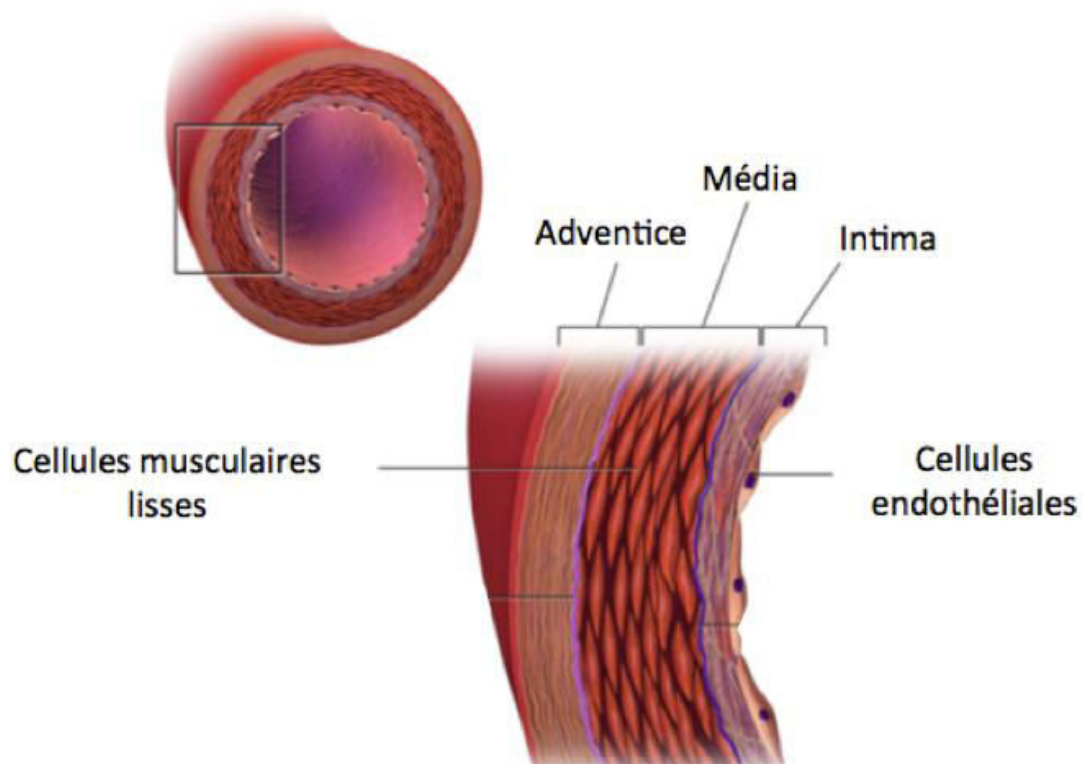


Figure 1 : Composition de la paroi artérielle (Blausen S. et coll., 2014)

Coupe transversale et agrandissement d'une artère. Elle est composée de trois couches : l'intima (cellules endothéliales), la media (cellules musculaires lisses vasculaires) et l'adventice.

Résumé de la revue abordant les fondements moléculaire des cellules musculaires lisses dans le vieillissement vasculaire :

La rigidité artérielle est un facteur de risque majeur de complications cardiovasculaires (insuffisance cardiaque, maladies rénales et accidents vasculaires cérébraux) provoquant une hypertension systolique isolée et une augmentation de la pression différentielle dans la microvascularisation des organes cibles. La revue présente les grands processus cellulaires et moléculaires du vieillissement vasculaire normal et accéléré, caractérisés principalement au niveau fonctionnel par le développement d'une rigidité artérielle. Cette rigidité va provoquer une inflammation artérielle et des modifications phénotypiques des cellules ainsi que des modifications structurelles de la média. Les deux phénotypes du vieillissement vasculaire sont l'athérosclérose (développement local de plaques) et l'artériosclérose (rigidification).

L'athérosclérose implique plusieurs types cellulaires, vasculaires et extravasculaires et différents facteurs moléculaires tels que les molécules d'adhésion, les lipoprotéines de basse densité oxydées, les facteurs de croissance, les cytokines et les métalloprotéinases.

L'artériosclérose est médiée par des modifications structurelles de la média et aboutit à une rigidification des artères, à leur fibrose ou encore à leur calcification. Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) font partie de la composition de la paroi des vaisseaux sanguins. Elles sont localisées dans la media. Les CMLVs sont mononucléées, adhérentes et différenciées.

Notre laboratoire et d'autres groupes de recherche ont mis en évidence que le vieillissement augmentait la contribution des CMLVs vis-à-vis de la matrice extracellulaire ainsi que des interactions avec les cellules endothéliales (CE), et les cellules immunitaires. Les CMLVs sont capables d'avoir divers phénotypes qui sont importants dans les maladies vasculaires liées à l'âge. Les CMLVs forment des adhérences focales qui augmentent la rigidité artérielle.

La rigidité de la paroi artérielle est classiquement déterminée par une pléthore de mécanismes communs, y compris la réduction du rapport élastine/collagène, la réticulation de l'élastine, l'inflammation induite par les espèces réactives de l'oxygène, la calcification vasculaire, la rigidification des CMLVs et la dysfonction endothéliale qui induisent des altérations des propriétés mécaniques de la paroi vasculaire.

Smooth Muscle Cell Molecular Underpinnings of Vascular Ageing



Veronique Regnault, PhD, Alexandre Raoul, BSc, Celia Schellenberg, BSc, Patrick Lacolley, MD, PhD*

Université de Lorraine, INSERM, DCAC, Nancy, France

Keywords Smooth muscle cell • Ageing • Arterial stiffness • Mechanotransduction

Arterial ageing assigns a key role to arterial stiffening in the continuum between healthy vascular ageing and the development and progression of hypertension, heart failure, kidney disease and stroke. Arterial stiffness is a major independent risk factor for cardiovascular complications causing isolated systolic hypertension and increased pulse pressure in the microvasculature of target organs. Vascular ageing causes chronic arterial inflammation and intimal-medial thickening through phenotypic changes in vascular cells and structural changes in the media. This editorial provides an update of the major cellular and molecular underpinnings of normal and accelerated vascular ageing, characterised primarily at the functional level by arterial stiffness. Defining the molecular mechanisms will help develop specific interventional targets for prevention or treatment of vascular disorders, and we describe the current progress/gaps in this regard.

Hallmarks of Vascular Ageing

Two (2) phenotypes that are the hallmarks of vascular ageing are atherosclerosis, which is a local development of plaques, and arteriosclerosis which develops all along the arterial tree [1]. A particular trait of atherosclerosis is involvement of multiple cell types, vascular cells but also extravascular cells, and different molecular factors such as adhesion molecules, oxidised low-density lipoproteins, growth factors, cytokines and metalloproteinases. For arteriosclerosis, it appears simpler, since it is primarily mediated by structural changes of the media which is a privileged site, avascular with only vascular smooth muscle cells (VSMCs) and without

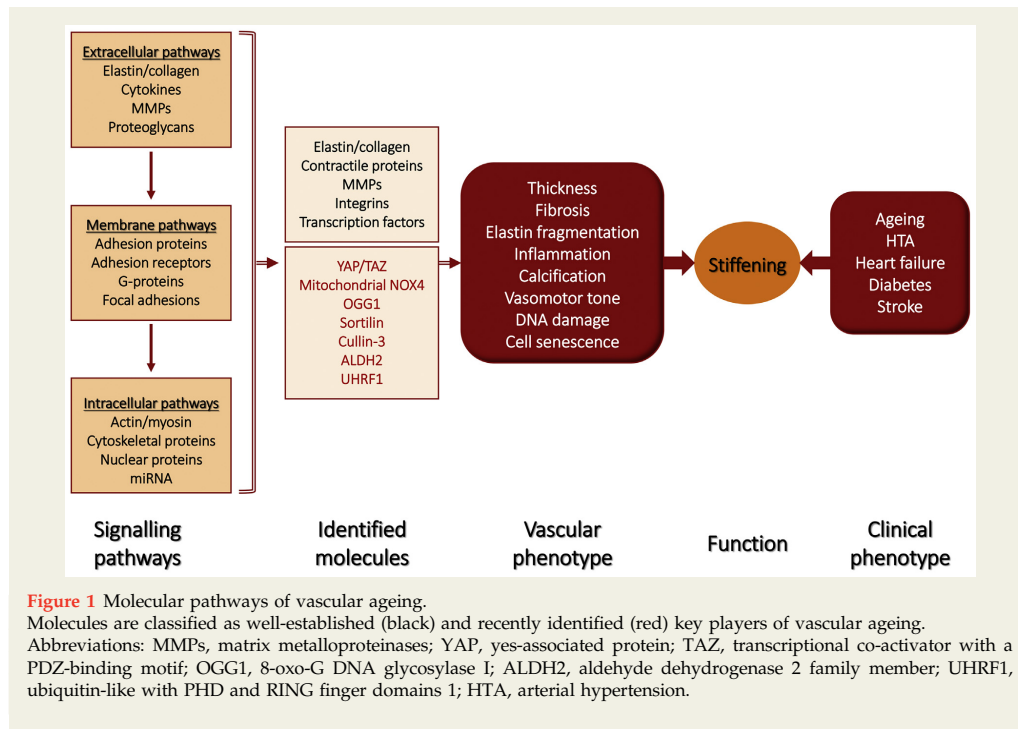
leucocytes. The onset of these two phenotypes occurs in parallel, even though several reports indicate that arterial stiffness precedes age-related full plaque development. Arteriosclerosis is mainly represented by central arterial stiffness, fibrosis, calcifications and increased arterial systolic and pulse pressure, dilation of the large arteries and carotid intimal-medial thickening [2,3]. Several reports, first from our team [4] and then from other groups, have highlighted that ageing would augment the contribution from VSMCs when compared with the extracellular matrix (ECM), together with their interactions with specific cell types, involving endothelial cells, immune cells, fibroblasts, and progenitor cells [1,5–7]. VSMCs acquire diverse phenotypes, which are crucial in age-related vascular diseases.

Integrin-Mediated Mechanotransduction

Current knowledge about the role of VSMC plasticity in arterial stiffness is based on considering an integrative network of VSMC molecules that determine both their phenotype and their functions, and this concerns first focal adhesions (FAs) (Figure 1). FA formation is a dynamic process characterised by association and dissociation between proteins. Their lifetime ranges from 10 seconds up to a few minutes. At rest, integrins are in a bent inactive conformation. Recruitment of talin induces integrin activation and clustering. The binding of talin to vinculin reinforces the actin-talin linkage, and forms the so-called molecular clutch. This process increases actin polymerisation, contraction and cell migration. The final maturation of FAs depends on

*Corresponding author at: Inserm U1116, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, CS 50184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France; Email: patrick.lacolley@inserm.fr

© 2021 Australian and New Zealand Society of Cardiac and Thoracic Surgeons (ANZSCTS) and the Cardiac Society of Australia and New Zealand (CSANZ). Published by Elsevier B.V. All rights reserved.



extracellular matrix (ECM) stiffness. On a soft ECM, interactions between integrin, talin and actin exhibit a slip bond behaviour that does not require vinculin. It has a short lifetime [8]. On a rigid ECM, the reinforcement due to vinculin constitutes a catch bond with a long FA life time. A current assumption is that the formation of catch bonds controls arterial stiffness via cell stiffness [9]. Hypertension increased vascular smooth muscle cell stiffness; this increase was further augmented with ageing in direct relation with adhesion [7].

Promising Insights From Newly Defined Molecular Pathways in Vascular Ageing

Recent advances in molecular underpinnings of vascular ageing have also highlighted the involvement of nuclear mechanotransduction, mitochondrial dysfunction, epigenetics and newly identified actors of senescence pathways [10,11]. For example, increasing evidence has positioned the Hippo pathway effectors yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with a PDZ-binding motif (TAZ) as key players in membrane-to-nuclear mechanotransduction (Figure 1). These two proteins need to shuttle into the nucleus

to bind transcription factors. The network formed by the actin cytoskeleton and the linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex controls nuclear mechanics. Nuclear deformation causes lamin A redistribution from the nucleus membrane to the nucleoplasm, which in turn drives YAP nuclear localisation. The NAD(+)-dependent histone deacetylase sirtuin-1 has been reported to block YAP nuclear translocation, thereby linking nuclear mechanotransduction and epigenetic regulation of vascular ageing [12]. In YAP mutants, the expression of FA proteins is reduced such as integrins and focal adhesion kinase (FAK), and this is associated with decreased cell contact areas and Young's Modulus. Inhibitors of RhoA/Rho kinase (ROCK) pathway induce YAP shuttling to the cytoplasm, triggered cytoskeleton disassembly and the disappearance of FAs. Therefore, YAP/TAZ nuclear localisation and expression of FA genes regulate FA assembly, which in turn determines VSMC migration, adhesion and stiffness [13]. The inability of the nucleus to respond dynamically to mechanical stress contributes to the Hutchinson-Gilford progeria syndrome, an accelerated form of ageing caused by mutations of prelamin A producing progerin accumulation and by deficiency of the mitotic checkpoint protein BUBR1 leading to cell senescence [14].

Mitochondrial dysfunction accelerates vascular ageing [15–18]. Mitochondrial and transmembrane NAPDH oxidases

(NOXs) represent the two main sources of reactive oxygen species (ROS). Mitochondrial NOX4 expression/activity in VSMC mitochondria has been reported to increase ROS (Figure 1). Mutant mice with a two-fold and 20-fold increase in Nox4 exhibit increased pulse wave velocity which is the most widely used measure of arterial stiffness and VSMC stiffening [19]. The mechanisms include an increased number of persistent FAs, DNA damage and senescence. Phosphorylated histone variant 2AX (γ H2AX) accumulated in mice with a 20-fold increase in Nox4 whereas the expression of the oxidative DNA base excision repair enzyme, 8-oxo-G DNA glycosylase I (OGG1), the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), the mitochondrial transcription factor A (TFAM) involved in mitochondrial biogenesis and the scavenger of mitochondrial superoxide SOD2 were markedly reduced [19]. Altogether, increased oxidative stress resulting in altered mitochondrial and nuclear DNA repair pathways fosters cell senescence and vascular ageing.

Dysregulated metabolism plays an essential rôle in early vascular senescence and calcification (Figure 1). Sortilin has been recently identified as a protein involved in calcification by controlling the trafficking of tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) to SMC-derived extracellular vesicles [20]. TNAP degrades inorganic pyrophosphate and provides free inorganic phosphate. The existence of an interaction between the adipose tissue and the cardiovascular system has been recently identified, showing the adipokine omentin-1 reduces VSMC calcification via activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)/Akt signalling [21]. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 family member (ALDH2) has been reported to protect VSMC from oxidised low-density lipoprotein-induced senescence by inhibiting mitochondrial ROS production, highlighting a link between mitochondrial and metabolic dysfunctions in ageing [22].

Notwithstanding the genetic contribution to arterial stiffness, the underlying molecular mechanisms have been poorly described. Mutations in the gene encoding cullin-3 have been identified by exome sequencing to regulate arterial stiffness [23]. Cullin-3 protein is associated with degradation of RhoA and decreased ROCK signalling. An additional mechanism has been identified, that is reduced expression of both subunits of soluble guanylyl cyclase, leading to impaired production and activity of cGMP [23].

Epigenetic mechanisms have gained much attention as master regulators of arterial stiffening, especially in ageing. Ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1 (UHRF1) is a typical example of complex epigenetic regulations (Figure 1). This protein has an essential role in DNA methylation, which usually decreases the expression of contractile genes. UHRF1 expression is increased in response to PDGF and decreased in response to TGF- β , which is inversely related to the expression of differentiation markers [24]. The mechanism partly involves non-coding RNAs such as microRNA-145, whose expression is itself downregulated and upregulated by PDGF and TGF- β respectively. UHRF1 knockdown causes a decrease in the histone repressive mark H3K27me3, thereby inducing transcriptional reactivation of

VSMC-specific genes as well as genes coding for cell cycle inhibitors [24]. Finally, in response to angiotensin II infusion, mean radial wall velocity is smaller in control mice which means that arterial stiffness is increased [24]. The decrease is blunted in KO mice. Altogether these findings highlight that UHRF1 exerts an aggravating role on arterial stiffness.

Different ageing trajectories have been identified, leading to the concept of "extremes" in vascular ageing. In healthy vascular ageing, a progressive arterial stiffening parallels hypertension and cardiovascular complications. In early vascular ageing (EVA), subjects arrive earlier at these steps than the average populations. Another trajectory, called supernormal vascular ageing has been defined by very low values of pulse wave velocity whatever the level of risk factors. These subjects may have several risk factors, yet they will not develop cardiovascular events. Akin to pulse wave velocity, measurement of telomere length may represent a reliable biomarker for identifying the trajectory of ageing at early stages of life. Indeed the blood (leukocyte)-and-muscle model of telomere dynamics has revealed that increased leukocyte telomere attrition in the first years of life precedes clinical manifestations of atherosclerosis [25]. Mounting data suggests that modifications of epigenetics programming may represent the molecular cues to drive these different ageing trajectories. There is also abundant evidence for a role for coagulation factors in the progression of age-related cardiovascular diseases. Both thrombin and activated factor X trigger thrombotic events with ageing but are also key modulators of non-haemostatic processes within the vasculature via G-protein coupled receptors, such as VSMC migration and proliferation, and FA activation. Therefore, links between arterial stiffness, immune cells and haemostatic factors may contribute to these different ageing trajectories.

Conclusion

The different steps from signalling pathways to stiffening and finally clinical phenotype are summarised in Figure 1. To gain much integrative insight of the molecular pathways driving vascular ageing, it is tempting to link these pathways in complex biological networks using computational approaches [10,11].

There is a need to identify strategies targeting these different pathways with specific drugs [26]. One promising strategy is to act at the interactions of these different pathways, in particular the dynamics of VSMC focal adhesions, cell senescence and oxidative stress. The final aim is to act before the elevation of pulse wave velocity by maintaining VSMC plasticity and preventing their senescence, the second is the possibility of returning to a normal state called homeostasis maintenance.

In summary, stiffening of the arterial wall is classically determined by a plethora of common mechanisms including reduced elastin/collagen ratio, elastin cross-linking, reactive oxygen species-induced inflammation, vascular calcification, vascular smooth muscle cell stiffness and endothelial

dysfunction that act in concert to induce vascular degeneration and alterations in vascular wall mechanical properties. Current biological mechanisms by which cardiovascular risk factors and their different times of exposure cause arterial stiffness also include membrane-to-nuclear mechanotransduction, cytoplasmic and mitochondrial oxidative stress, dysregulated metabolism, genome mutations and epigenetics. All these mechanisms are shared to various extents by ageing and comorbidities. They provide a new framework for understanding smooth muscle cell diversity including mechanisms operating at the level of cell senescence and how individual cell behaviours integrate the complex extracellular matrix that endows arteries with stiffness and strength. Computational approaches connecting these different molecular pathways could promote multi-targeted interventions to clinically arrest or reverse stiffening, and improve personalised treatment at different time points of cardiovascular risk factor exposure.

References

- [1] Lacolley P, Regnault V, Segers P, Laurent S. Vascular smooth muscle cells and arterial stiffening: relevance in development, aging, and disease. *Physiol Rev*. 2017;97(4):1555–617.
- [2] Lacolley P, Regnault V, Avolio AP. Smooth muscle cell and arterial aging: basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res*. 2018;114(4):513–28.
- [3] Safar ME, Asmar R, Benetos A, Blacher J, Boutouyrie P, Lacolley P, et al. Interaction between hypertension and arterial stiffness. *Hypertension*. 2018;72(4):796–805.
- [4] Bezie Y, Lamaziere JM, Laurent S, Challande P, Cunha RS, Bonnet J, et al. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(7):1027–34.
- [5] Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000;36(3):312–8.
- [6] O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension*. 2005;46(1):200–4.
- [7] Sehgel NL, Sun Z, Hong Z, Hunter WC, Hill MA, Vatner DE, et al. Augmented vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion when hypertension is superimposed on aging. *Hypertension*. 2015;65(2):370–7.
- [8] Lacolley P, Regnault V, Laurent S. Mechanisms of arterial stiffening: from mechanotransduction to epigenetics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(5):1055–62.
- [9] Saphirstein RJ, Gao YZ, Jensen MH, Gallant CM, Vetterkind S, Moore JR, et al. The focal adhesion: a regulated component of aortic stiffness. *PLoS One*. 2013;8(4):e62461.
- [10] Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature*. 2011;475(7356):316–23.
- [11] Regnault V, Challande P, Pinet F, Li Z, Lacolley P. Cell senescence: basic mechanisms and the need for computational networks in vascular ageing. *Cardiovasc Res*. 2021;117(8):1841–58.
- [12] Ding Y, Han Y, Lu Q, An J, Zhu H, Xie Z, et al. Peroxynitrite-mediated SIRT (Sirtuin)-1 inactivation contributes to nicotine-induced arterial stiffness in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(7):1419–31.
- [13] Nardone G, Oliver-De La Cruz J, Vrbsky J, Martini C, Pribyl J, Skladal P, et al. YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly. *Nat Commun*. 2017;8:15321.
- [14] Childs BG, Li H, van Deursen JM. Senescent cells: a therapeutic target for cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2018;128(4):1217–28.
- [15] De Meyer GR, Grootaert MO, Michiels CF, Kurdi A, Schrijvers DM, Martinet W. Autophagy in vascular disease. *Circ Res*. 2015;116(3):468–79.
- [16] Foote K, Reinhold J, Yu EPK, Figg NL, Finigan A, Murphy MP, et al. Restoring mitochondrial DNA copy number preserves mitochondrial function and delays vascular aging in mice. *Aging Cell*. 2018;17(4):e12773.
- [17] Jang JY, Blum A, Liu J, Finkel T. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest*. 2018;128(9):3662–70.
- [18] Paneni F, Diaz Canestro C, Libby P, Luscher TF, Camici GG. The aging cardiovascular system: understanding it at the cellular and clinical levels. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(15):1952–67.
- [19] Canugovi C, Stevenson MD, Vendrov AE, Hayami T, Robidoux J, Xiao H, et al. Increased mitochondrial NADPH oxidase 4 (NOX4) expression in aging is a causative factor in aortic stiffening. *Redox Biol*. 2019;26:101288.
- [20] Goetsch C, Hutcheson JD, Aikawa M, Iwata H, Pham T, Nykjaer A, et al. Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles. *J Clin Invest*. 2016;126(4):1323–36.
- [21] Xie H, Xie PL, Wu XP, Chen SM, Zhou HD, Yuan LQ, et al. Omentin-1 attenuates arterial calcification and bone loss in osteoprotegerin-deficient mice by inhibition of RANKL expression. *Cardiovasc Res*. 2011;92(2):296–306.
- [22] Zhu H, Wang Z, Dong Z, Wang C, Cao Q, Fan F, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency promotes atherosclerotic plaque instability through accelerating mitochondrial ROS-mediated vascular smooth muscle cell senescence. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(7):1782–92.
- [23] Agbor LN, Nair AR, Wu J, Lu KT, Davis DR, Keen HL, et al. Conditional deletion of smooth muscle Cullin-3 causes severe progressive hypertension. *JCI Insight*. 2019;5:e129793.
- [24] Elia L, Kunderfranco P, Carullo P, Vacchiano M, Farina FM, Hall IF, et al. UHRF1 epigenetically orchestrates smooth muscle cell plasticity in arterial disease. *J Clin Invest*. 2018;128(6):2473–86.
- [25] Climie RE, Park C, Avolio A, Mynard JP, Kruger R, Bruno RM. Vascular ageing in youth: a call to action. *Heart Lung Circ*. 2021.
- [26] Laurent S, Boutouyrie P, Cunha PG, Lacolley P, Nilsson PM. Concept of extremes in vascular aging. *Hypertension*. 2019;74(2):218–28.

3. Inflammation

3.1 Inflammation locale

L'inflammation dite locale est la plus commune. Elle représente la réaction du système immunitaire face à des agressions par des agents infectieux ou encore des blessures.

Une inflammation locale se manifeste directement sur la ou les zones affectées. C'est le système immunitaire inné qui va combattre cette inflammation. Rougeur, douleur, démangeaison sont des symptômes classiques d'une inflammation locale.

3.2 Inflammation systémique

L'inflammation systémique représente une inflammation chronique. Le système immunitaire doit sans cesse défendre le corps. L'inflammation systémique peut être la conséquence du stress, des infections, des maladies chroniques ou des maladies auto-immunes. L'inflammation systémique résulte de nombreuses conditions différentes qui induisent une activation anormale et persistante du système immunitaire, entraînant une altération du fonctionnement de plusieurs organes et tissus.

Ce qu'il faut retenir :

Maladies cardiovasculaires

2^{ème} cause de décès en France

Augmentation du nombre de facteurs de risques dans les pays développés

Facteurs de risques : tabagisme, alimentation, sédentarité, maladies inflammatoires

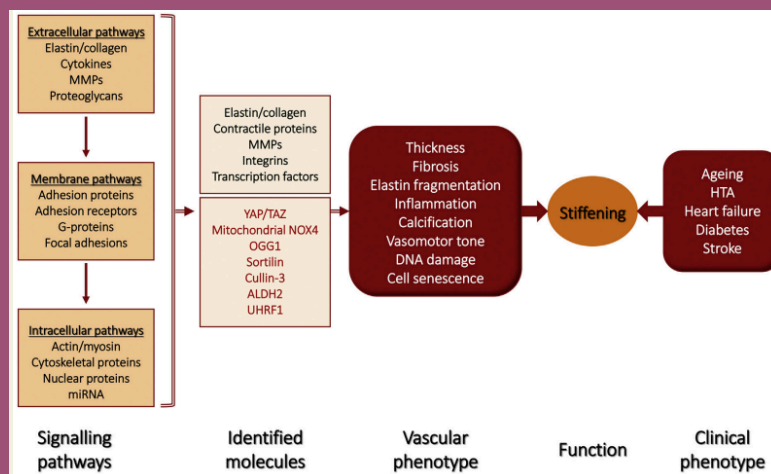


Vieillesse vasculaire

Rôle clé de la rigidité artérielle

Développement de l'hypertension, insuffisance cardiaque, maladies rénales et accidents vasculaires cérébraux

Inflammation artérielle chronique et divers changements de la paroi des artères et des cellules vasculaires dus au vieillissement



4. Hémostase et thrombose

4.1 L'hémostase primaire

L'hémostase est l'ensemble des phénomènes physiologiques qui concourent à la prévention et à l'arrêt des saignements en participant à la réparation d'une brèche vasculaire et en assurant le maintien de l'intégrité des vaisseaux. Elle aboutit à la formation d'un thrombus « blanc » composé de plaquettes (*figure 2*).

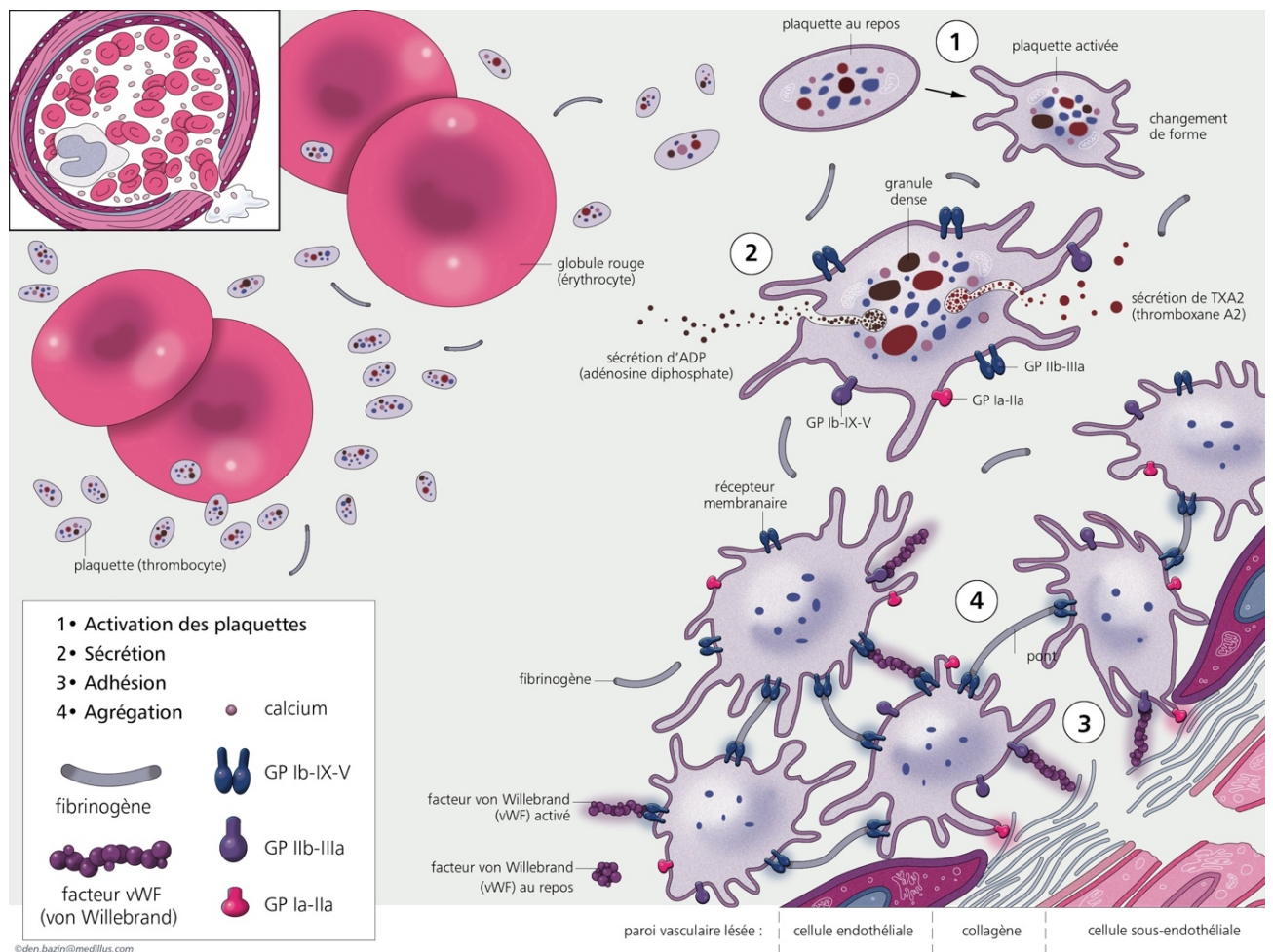


Figure 2 : Représentation de l'hémostase primaire et des différentes étapes de l'activation des plaquettes (La filière des maladies hémorragiques constitutionnelles MHEMO <https://mheмо.fr/>)

L'hémostase primaire est composée de 4 grandes étapes : 1. L'activation des plaquettes : lors de leur activation, les plaquettes changent de conformation 2. La sécrétion de leur contenu : les plaquettes vont relarguer le contenu des granules et vont sécréter de l'ADP et du thromboxane A2. 3. L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium. 4. L'agrégation des plaquettes pour former un thrombus blanc à l'aide du facteur de von Willebrand (VWF) et du fibrinogène.

Dans l'hémostase primaire, il y a plusieurs acteurs : les vaisseaux, les plaquettes, le fibrinogène et le facteur von Willebrand (VWF). Il faut également l'aide de plusieurs molécules d'adhésion comme les glycoprotéines (GP) GPIb-IX-V⁹ qui se lient au facteur VWF présent au niveau du sous-endothélium et la GPIa-IIa qui se fixe au collagène au niveau du vaisseau lésé. Le facteur VWF se lie également au collagène du sous-endothélium. Lorsque les plaquettes adhèrent au sous-endothélium par l'intermédiaire du facteur VWF, la GPIIb-IIIa peut alors fixer le fibrinogène qui forme des ponts entre les plaquettes activées (agrégation)¹⁰. Les granules jouent également un rôle dans l'agrégation de celles-ci. Lorsque les plaquettes adhérentes au vaisseau lésé sont activées, elles libèrent dans la circulation sanguine le contenu de leurs granules qui favorise et entretient leur agrégation¹¹. Des réactions biochimiques se produisent également au sein des plaquettes activées, permettant la formation de molécules qui favorisent et stabilisent l'agrégation plaquettaire. Parmi ces molécules, la thrombospondine-1 sécrétée par les granules va intensifier l'activation des plaquettes et consolider le thrombus¹². Ces réactions permettent également aux plaquettes activées d'exposer les phospholipides à leur surface et de participer à l'étape suivante, la coagulation. Le facteur tissulaire exposé va initier la génération de thrombine qui convertit le fibrinogène en réseau de fibrine mais active également les plaquettes pour renforcer le thrombus ainsi formé¹³. Le duo agrégat plaquettaire et fibrine forme un caillot stable.

4.2 La plaquette sanguine

Les plaquettes représentent les plus petites cellules de la circulation sanguine avec environ 2,5 μm de diamètre et 0,5 μm d'épaisseur. Elles sont libérées par les mégacaryocytes de la moelle osseuse. Une partie des plaquettes est stockée dans la rate. Les plaquettes ont une durée de vie dans la circulation sanguine comprise entre 7 et 10 jours chez l'homme et 3 à 5 jours chez la souris. La numération plaquettaire chez l'homme est comprise entre 150 000 et 400 000 plaquettes par mm^3 de sang¹⁴. Chez la souris, la numération plaquettaire peut aller jusqu'à plus d'un million par mm^3 ¹⁵.

Sur la totalité des plaquettes, seule une fraction est utilisée lors des processus hémostatiques. Le reste est éliminé par phagocytose au niveau de la rate, du foie et de la moelle osseuse par les monocytes et les macrophages.

Une numération plaquettaire inférieure à 150 000 plaquettes par mm^3 de sang est appelée thrombocytopenie et peut altérer la formation du clou plaquettaire et augmenter le risque de saignement. A l'inverse, une numération plaquettaire supérieure à 600 000 plaquettes par mm^3

de sang est appelée thrombocytémie et va engendrer des évènements thrombotiques comme des infarctus, des ischémies et des accidents vasculaires cérébraux.

Plusieurs étapes d'activation plaquettaire peuvent être distinguées : l'adhésion initiale, l'activation au contact de la paroi lésée, la sécrétion et l'amplification de l'activation, et enfin l'agrégation des plaquettes entre elles ¹⁶. Ces différentes étapes impliquent une large gamme de récepteurs membranaires (*tableau 1*).

Nom du récepteur	Intégrines	Ligands	Informations
GPIa-IIa	$\alpha_2\beta_1$ $\alpha_v\beta_1$ $\alpha_5\beta_1$ $\alpha_6\beta_1$	Collagène Vitronectine Laminine Fibronectine	Régulation positive via une activation qui dépend de la liaison du collagène à la GPVI
GPVI		Collagène	Le récepteur clé du collagène, déclenche l'activation, la libération d'agonistes qui augmentent l'avidité des intégrines $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$
GPIb-IX-V		VWF et thrombine	25 000 copies à la surface des membranes plaquettaires
GPIIb-IIIa	$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogène et VWF	50 000 complexes à la surface des plaquettes

Tableau 1 : Les récepteurs membranaires des plaquettes d'après Yu et al. 2012 et Zlamal et al. 2018

Les plaquettes contiennent des organelles qui libèrent leur contenu lors de l'activation plaquettaire : les granules α et les granules denses (*figure 3*).

Les granules α contiennent des molécules comme le fibrinogène, le facteur VWF et la fibronectine. Lors d'une inflammation, les granules α vont sécréter des facteurs pro-inflammatoires (chimiokines) ¹¹. Les granules denses contiennent l'adénosine 5' diphosphate (ADP) et l'adénosine triphosphate (ATP)

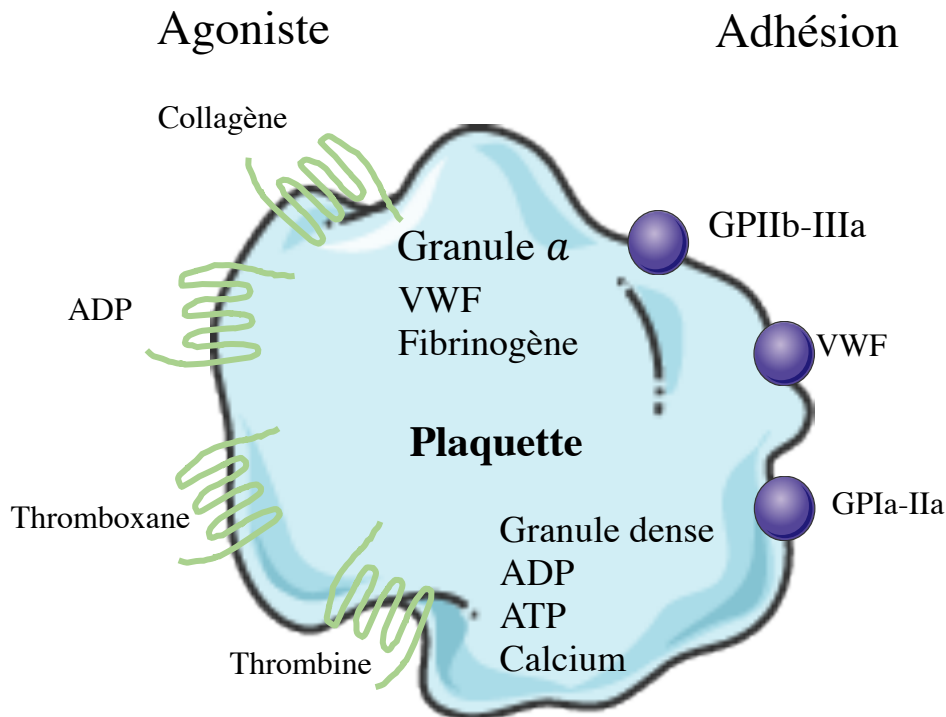


Figure 3 : Représentation schématique d'une plaquette avec son contenu et ses différents récepteurs

4.3 Le facteur von Willebrand

Résumé de la revue abordant le facteur VWF :

Le facteur VWF est une glycoprotéine multimérique sécrétée par les cellules endothéliales (environ 80 %) et les mégacaryocytes (20 %) ¹⁷. Il possède plusieurs rôles : il permet l'adhésion des plaquettes au vaisseau endommagé et sert de transporteur pour le facteur VIII de la coagulation. Il peut être sécrété de manière constitutive ou stocké dans les corps de Weibel Palade jusqu'à sa sécrétion par un stimulus. Au niveau des plaquettes, le facteur VWF est stocké dans les granules α d'où il sera sécrété à la suite de l'activation des plaquettes. Le facteur VWF intervient dans la coagulation, dans l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, l'inflammation ainsi que la survie tumorale. Le facteur VWF est responsable de plusieurs pathologies : la maladie de Willebrand (maladie hémorragique) ¹⁸ et du purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT) (microangiopathie thrombotique avec anémie et thrombopénie) ¹⁹.

Le facteur VWF est impliqué dans l'hémostase et ses liens avec la physiopathologie vasculaire ont été mis en évidence il y a plusieurs dizaines d'années.

La plupart des facteurs de la coagulation ainsi que leurs voies de signalisations et leurs modes d'action sont connus. Pour le facteur VWF, cela n'a commencé à être identifié que très récemment. Il participe à la prolifération des CMLVs à l'aide d'une signalisation dépendante de la protéine 4 liée aux récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LRP4) et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le facteur VWF a des fonctions angiogéniques en induisant à la fois la migration des CMLVs et en apportant des facteurs de croissance. Le flash scientifique qui suit présente en détail les implications du facteur VWF dans la physiologie de la paroi vasculaire en abordant les rôles cellulaires et les voies de signalisations.

Implications des protéines de l'hémostase dans la physiopathologie de la paroi vasculaire : exemple du facteur von Willebrand

Implications of hemostasis proteins in the vascular wall physiopathology: example of the von Willebrand factor

Jeremy LAGRANGE^{1,2}, Célia SCHELLENBERG^{1,2}

1. INSERM U1116, Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

2. Université de Lorraine, Nancy, France.

Courriel : jeremy.lagrange@inserm.fr

RÉSUMÉ

Les pathologies artérielles, en particulier l'athérosclérose, sont à l'origine de thromboses potentiellement mortelles. Dans ces pathologies, le concours des facteurs de la coagulation et de protéines étroitement associées est un événement terminal. Pourtant, depuis une vingtaine d'années, des rôles cellulaires des facteurs de la coagulation ont été mis en évidence mettant en lumière tout un pan de fonctions jusqu'alors inexploré des facteurs de la coagulation et de l'hémostase. Les facteurs identifiés l'ont été grâce aux recherches portant sur les récepteurs impliqués dans l'hémostase, et plus particulièrement les récepteurs de l'activation plaquettaire. Cependant, ces récepteurs étant présents à la surface d'autres cellules, notamment vasculaires, les fonctions allant au-delà de l'hémostase ont très rapidement été étudiées. Le facteur von Willebrand (VWF) est une glycoprotéine impliquée dans l'hémostase et dont les liens avec la physiopathologie vasculaire ont été mis en évidence il y a plusieurs dizaines d'années. Cependant, contrairement aux facteurs de la coagulation dont les cibles ont été identifiées en premier lieu, les voies de signalisation et les modes d'action du VWF sur les cellules vasculaires n'ont commencé à être identifiés que récemment. Ainsi, dans cette revue, nous allons revenir sur les effets cellulaires propres à la physiopathologie vasculaire des facteurs intervenants dans l'hémostase, et plus particulièrement aux données propres au VWF.

Mots clés : facteur von Willebrand, cellules musculaires lisses vasculaires, angiogenèse, athérosclérose.

ABSTRACT

Arterial diseases, in particular atherosclerosis, are responsible for potentially fatal thromboses. In these diseases, the concurrence of coagulation factors and of closely involved proteins constitutes a terminal event. However, for the past twenty years, cellular functions of coagulation factors have been demonstrated by highlighting a whole previously unexplored range of functions of coagulation and hemostasis factors. The factors were identified through research focused on receptors important in hemostasis and more particularly for platelet activation. However, since these receptors are also present on the surface of other cells, in particular vascular cells, functions going beyond hemostasis were very quickly investigated. Von Willebrand factor (VWF) is a glycoprotein involved in hemostasis and whose links with vascular pathophysiology have been demonstrated several decades ago. However, contrary to coagulation factors where receptors were first identified, the signaling pathways and modes of action of VWF on vascular cells have only recently started to be identified. Thus, in this review, we will focus to the cellular effects specific to the vascular pathophysiology of the factors involved in hemostasis and more particularly to the data related to VWF.

Keywords: von Willebrand factor, vascular smooth muscle cells, angiogenesis, atherosclerosis.

Rev Francoph Hémost Thromb 2021 ; 3 (2) : 101-7.

INTRODUCTION

Le facteur von Willebrand (VWF) est une protéine multimerique très liée à l'hémostase. Il intervient à la fois dans l'hémostase primaire en permettant le recrutement des plaquettes au niveau d'une brèche vasculaire via les récepteurs GPIIb/IIIa et GPIIb/IIIa, et également au niveau de la coagulation via sa capacité à transporter le facteur VIII. Le VWF est synthétisé par les cellules endothéliales (CE), et peut être stocké dans les corps de Weibel-Palade et sécrété après activation des CEs. Une fraction du VWF est également synthétisée et sécrétée de manière constitutive. Au-delà de ses fonctions lors de l'hémostase, le VWF est impliqué dans d'autres processus physiopathologiques tels que la prolifération tumorale, l'angiogenèse et la modulation de la réponse inflammatoire **1**.

Le risque de thrombose, en particulier artériel, est principalement perçu comme étant une conséquence du développement de pathologies vasculaires. Cependant, depuis une vingtaine d'années, la possibilité que les protéines de l'hémostase affectent elles-mêmes et de façon directe le cours de la maladie a commencé à être envisagé. Le VWF est associé depuis plusieurs dizaines d'années à des processus vasculaires. Pourtant, plusieurs voies de signalisation permettant d'expliquer ses effets n'ont été mises en évidence que récemment. Dans cette revue, nous proposons de revenir sur les effets cellulaires propres à la physiopathologie vasculaire des facteurs intervenant dans l'hémostase. Par la suite, nous allons nous focaliser plus spécifiquement sur les données connues pour le VWF.

LES PROTÉINES INTERVENANT DANS L'HÉMOSTASE : DES RÔLES CELLULAIRES DIVERS

Le lien entre les modifications de l'hémostase et les pathologies vasculaires est bien établi. L'hypertension artérielle, qui touche près d'un cinquième de la population adulte, est ainsi le principal facteur de risque cardiovasculaire. Si elle n'est pas traitée, elle peut aboutir à un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral. Les pathologies athérotrombotiques se caractérisent par un épaississement intimal faisant suite à une convection de lipides du sang vers la paroi vasculaire et au développement de plaques athéromateuses. Ces plaques sont composées d'un noyau lipidique entouré d'une matrice fibreuse et de cellules musculaires

lisses vasculaires (CMLVs) ayant migré de la media. L'évènement terminal du développement de ces plaques est leur rupture et la survenue de thromboses au site de rupture ou la formation d'embolies.

Les facteurs de la coagulation, et plus généralement les protéines impliquées dans l'hémostase, ne sont pas cantonnés à leurs fonctions hémostatiques. En effet, un certain nombre d'entre eux induisent des effets cellulaires directs en particulier sur les cellules de la paroi vasculaire. L'hypothèse selon laquelle les protéines liées à l'hémostase pourraient être responsables de certaines pathologies cardiovasculaires a été proposée par Duguid dans les années 1960. Cette « *thrombogenic theory* » avait suggéré que les plaques d'athérome pourraient avoir pour origine des *thrombi* luminaux qui seraient incorporés dans la media puis recouverts d'un néo-endothélium **2**.

Cependant, il aura fallu attendre les années 1990 avec la découverte des récepteurs activés par les protéases (PAR : *protease activated receptor*) pour commencer à réellement comprendre les actions des protéines de l'hémostase sur certaines cellules. Ces récepteurs, au nombre de 4, sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. La synthèse et le type de récepteur peuvent varier en fonction du type cellulaire ou de l'espèce. Les récepteurs PAR initialement identifiés sont les récepteurs pour la thrombine des plaquettes, et il est intéressant de voir que ces cellules sont à présent également bien connues pour jouer un rôle majeur dans le développement des pathologies athéromateuses.

Au milieu des années 1990, l'émergence des modèles animaux transgéniques a aussi fait avancer l'hypothèse d'une participation directe de certains facteurs de la coagulation à la physiologie vasculaire. Cela a notamment été le cas pour le facteur tissulaire (FT) puisqu'il a été noté que l'inactivation du gène *FT*, bien que létale dès le stade embryonnaire, est associée à une désorganisation des vaisseaux du sac vitellin mettant pour la première fois en lumière l'importance du FT dans le développement des vaisseaux **3**.

L'athérosclérose est associée à une augmentation de la synthèse de FT mais également d'autres facteurs de la coagulation tels que le FVII et le FX. Tous ces facteurs peuvent être synthétisés par les macrophages et les CMLVs présents dans les plaques. De manière intéressante, ces fac-

teurs peuvent activer les récepteurs PARs puisqu'ils sont présents à la surface des macrophages ou encore des CMLVs (Figure 1). Ainsi, le complexe FT/FVIIa peut activer PAR-2 et participer à l'angiogenèse, à la migration et à la prolifération des CMLVs. Le facteur X activé (FXa) a aussi la capacité d'induire la prolifération des CMLVs en activant PAR-1 et -2. Par son implication dans l'activation des plaquettes via les récepteurs PARs, les effets de la thrombine sur d'autres cellules par l'intermédiaire de ces récepteurs ont été très largement explorés. Ainsi, il a été démontré que la thrombine pouvait moduler la migration, la réponse inflammatoire, et l'expression de gènes dans différents types cellulaires, mais également la réactivité vasculaire artérielle au niveau d'artères pulmonaires. Pour les CMLVs, la thrombine agit plus particulièrement comme un facteur de croissance. En effet, via PAR-1, -2 et -4, la thrombine induit la migration et la prolifération des CMLVs participant au remodelage vasculaire. De plus, il a été montré que la concentration en thrombine présente dans le tissu vasculaire présentant des lésions liées à l'athérosclérose est suffisante pour permettre l'activation de PAR-1. Ainsi, la thrombine et le FXa pourraient participer de manière active à l'altération de la paroi vasculaire tout en augmentant son potentiel thrombogénique.

Enfin, les différents traitements dirigés contre des facteurs de la coagulation activant les PARs (anti-FXa ou antithrombine) peuvent limiter le développement de l'athérosclérose et d'anévrismes dans des modèles expérimentaux. Au niveau clinique, l'utilisation des inhibiteurs du FXa a été étudiée dans le cadre de l'insuffisance cardiaque avec l'étude COMMANDER 4. L'utilisation d'un inhibiteur du FXa

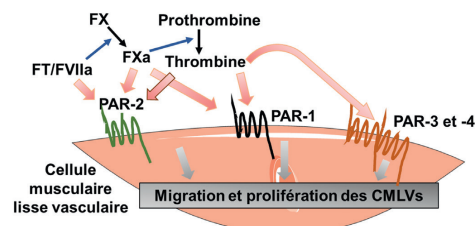


Figure 1 : Rôles des récepteurs activés par les protéases (PARs) sur les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs).

Les 4 types de récepteurs PARs sont exprimés par les CMLVs et peuvent être activés par plusieurs facteurs de la coagulation et provoquer la migration et la prolifération des CMLVs.

Figure 1: Protease activated receptors (PARs) roles on vascular smooth muscle cells (CMLVs).

n'a pas pu diminuer le risque d'infarctus, d'AVC ni de décès. Cependant, l'évolution de la réactivité vasculaire ou des marqueurs de la progression de l'athérosclérose n'a pas été analysée dans cette étude. La question se pose de l'intérêt sur le long terme de l'inhibition des effets cellulaires de la thrombine chez les patients atteints de pathologies ayant des retentissements cardiovasculaires.

Ainsi, les facteurs de la coagulation identifiés comme ayant des effets cellulaires dépendants majoritairement des récepteurs PARs pourraient influencer le développement de l'athérosclérose. Cet axe a été le plus étudié, et est encore très ciblé du fait de l'utilisation de traitements anticoagulants dirigés contre la thrombine et le FXa. D'autres protéines de l'hémostase pourraient posséder des effets cellulaires dépendant d'autres récepteurs.

INDICES D'UNE PARTICIPATION DU VWF INDÉPENDANTE DE L'HÉMOSTASE À LA BIOLOGIE DE LA PAROI VASCULAIRE

Au niveau des CE, le VWF peut être sécrété à la fois du côté apical et basolatéral des cellules. Une forme de VWF de bas poids moléculaire est sécrétée de manière constitutive et indépendamment des corps de Weibel-Palade, principalement du côté basolatéral des cellules endothéliales. Parallèlement, les CE secrètent du VWF de haut poids moléculaire via les corps de Weibel-Palade. Bien que la grande majorité (90 %) soit sécrétée du côté apical des cellules, une partie est sécrétée du côté basolatéral. Ainsi, le VWF n'est pas uniquement présent au niveau des CE, des plaquettes et du plasma, mais aussi dans le sous-endothélium 5.

La possible participation du VWF aux pathologies vasculaires a été envisagée avec l'utilisation de modèles animaux comme le modèle d'angioplastie de la carotide chez le lapin. En effet, la présence de VWF directement dans l'espace néo-intimal a été démontrée dans ce modèle qui induit un épaississement intimal. Bosmans *et al.* ont ainsi émis l'hypothèse d'une participation directe du VWF à la migration des CMLVs et à la formation de la néo-intima 6. Deux ans après cette première étude, en 1999, des dépôts de VWF ont été constatés au niveau des plaques dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin. La présence de VWF au niveau même des lésions a été associée à une augmentation de la synthèse de VWF par les CE 7.

Enfin, chez des patients atteints de la maladie de Willebrand, plusieurs indices lient les altérations ou l'absence de la protéine à des troubles vasculaires. Il existe plusieurs types de maladie de Willebrand, principalement :

- le type 1 caractérisé par une diminution des concentrations en VWF sans atteinte fonctionnelle ;

- le type 2A caractérisé par une perte d'activité due à la difficulté à former des multimères ;
- le type 2B caractérisé par une mutation du domaine A1 de la protéine provoquant une augmentation de l'affinité du VWF pour le GPIIb induisant une activation et une agrégation des plaquettes, ce qui conduit au développement d'une thrombocytopenie et à des risques de saignements ;
- le type 3 caractérisé par une absence de synthèse de VWF. De manière intéressante, les malformations vasculaires, et en particulier les angiodyplasies du système digestif, sont des complications fréquemment observées dans les maladies de Willebrand de types 2A, 2B et 3.
Toutes ces observations indiquent un lien très étroit entre la biologie du VWF et la régulation de la physiologie vasculaire. Ce n'est que depuis une dizaine d'années que plusieurs voies de signalisation ont été identifiées et détaillées confirmant les fonctions cellulaires du VWF, et particulièrement au niveau des cellules de la paroi vasculaire.

IDENTIFICATION DES VOIES DE SIGNALISATION ANGIOGÉNIQUES IMPLIQUANT LE VWF

Une interdépendance fonctionnelle entre les CMLVs et le VWF a été montrée dans le travail de Schepke *et al.*, publié en 2012 **8**. Ce travail a permis de mettre en évidence le fait que le VWF intervenait dans la maturation de la paroi vasculaire en agissant sur les CMLVs par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de la voie de signalisation *Notch*. Cette voie de signalisation est nécessaire au développement des artères et son inhibition empêche le recouvrement de celles-ci par les CMLVs. Cette action est possible via *Jag1* (jagged 1) qui est un ligand de *Notch* produit par les CEs. L'absence de ce ligand chez des souris conditionnellement déficientes dans les CEs grâce au promoteur *Tie2* amoindrit le recrutement de CMLVs au niveau des artères. Plus particulièrement, les CMLVs ne sont pas recrutées spécifiquement au niveau des CEs déficientes pour *Jag1*. L'activation de *Notch* par *Jag1* provoque la synthèse d' $\alpha_v\beta_3$ qui est aussi cruciale dans le développement artériel. Ainsi, le pourcentage de recouvrement par les CMLVs des artères rétinienne de souris déficientes pour la signalisation de cette intégrine est presque 4 fois moins important que chez les souris contrôles. Enfin, le dernier maillon identifié de cette chaîne a été le VWF puisque l' $\alpha_v\beta_3$ avait déjà été identifiée comme étant capable de lier cette protéine par l'intermédiaire d'une séquence RGD **9**. Dans ce contexte, une absence de VWF conduit aussi à une diminution du recouvrement des artères rétinienne par les CMLVs.

Plus récemment, en 2019, un travail portant sur les fonctions proangiogéniques du VWF a été publié dans *Blood* **10**. Ces

fonctions ont été pressenties après avoir constaté la présence de malformations vasculaires chez les patients présentant un déficit en VWF. Dans ce travail, l'utilisation d'un modèle de souris déficientes en VWF a permis de montrer une altération importante de la cicatrisation. Parallèlement, il a été montré que le VWF avait la capacité de lier de nombreux facteurs de croissance tels que le VEGF-A165, PIGF-2 (*placenta growth factor 2*), PDGF-AA, -BB, -CC, -DD (*platelet derived growth factor*), FGF-2 (*fibroblast growth factor*), FGF-7, FGF-18, TGF- β 1 (*transforming growth factor*), BMP-2 (*bone morphogenetic protein 2*), NGF- β (*nerve growth factor- β*), NT-3 (*neurotrophin-3*) ou encore CXCL-12 γ (*chemokine (C-X-C motif) ligand*). Ces résultats ont particulièrement mis l'accent sur la capacité du VWF à lier des facteurs de croissance fixant l'héparine. De manière intéressante, le VWF est colocalisé avec le VEGF-A dans des cultures de CEs à l'intérieur même des corps de Weibel-Palade. De plus, après stimulation des cellules engendrant la libération du VWF, ce dernier reste dans le surnageant cellulaire lié au VEGF-A. La présence de VWF lié à du VEGF-A (mais également à du FGF-2) a aussi été mise en évidence directement dans le plasma de sujets sains. Une compétition réalisée entre l'héparine et les facteurs de croissance avec le VWF a permis de montrer que la capacité du VWF à lier des facteurs de croissance dépendait de son site de liaison à l'héparine présent dans son domaine A1. Ainsi, le VWF peut lier le VEGF-A via son domaine A1 et sans que cela n'affecte sa capacité à interagir avec ses récepteurs habituels comme la GPIIb. Enfin, la cicatrisation est améliorée chez des souris déficientes en VWF et traitées avec le domaine de liaison à l'héparine du VWF.

Dans ce même article, d'autres données concernant des patients atteints du type 2B de la maladie de Willebrand sont présentées. Certains patients portent une mutation bien particulière qui se situe en position R1341 dans le domaine de liaison à l'héparine. Dans ces cas, le VWF perd sa capacité à lier les facteurs de croissance, en particulier le VEGF-A165, le PDGF-BB, et le FGF-2. Ce résultat est à mettre en lien avec les angiodyplasies du système digestif qui peuvent exister chez certains patients. En revanche, il n'est pas encore connu que ces patients atteints d'angiodyplasie ont majoritairement, ou non, cette mutation affectant le domaine de liaison à l'héparine.

Les fonctions angiogéniques du VWF commencent à être mieux connues, et notamment deux spécifiques, l'une en tant que transporteur de facteurs de croissance, et l'autre en tant qu'effecteur de la migration des CMLVs (*Figure 2*). Ces fonctions étant physiologiques et le VWF ayant été décrit dans le sous-endothélium d'artères pathologiques, la question se pose de son implication dans les pathologies

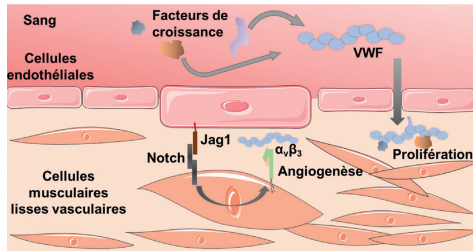


Figure 2 : Voies de signalisations angiogéniques impliquant le facteur de von Willebrand (VWF).

Les cellules endothéliales induisent un signal proangiogénique en activant la voie *Notch* par l'intermédiaire de *Jag1*, et le VWF peut amplifier le signal prolifératif via l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le VWF peut également se lier à un large panel de facteurs de croissance qu'il peut transporter dans la paroi vasculaire.

Figure 2: Angiogenic signaling pathways related to von Willebrand factor.

associées à une migration et une prolifération anormales de CMLVs.

PARTICIPATION DU VWF À LA PROLIFÉRATION DES CMLVs : IDENTIFICATION D'UNE SIGNALISATION DÉPENDANTE DE LRP4 ET DE L'INTÉGRINE $\alpha_v\beta_3$

Au niveau de la paroi artérielle, les CMLVs jouent un rôle majeur dans le maintien structural de la paroi. Cependant, dans certaines pathologies, ces cellules peuvent migrer et proliférer dans d'autres compartiments. C'est notamment le cas de l'athérosclérose où un épaississement de l'intima est observé avec la migration de CMLVs depuis la media. En plus de ses rôles décrits précédemment dans l'angiogenèse, la question s'est donc posée de l'implication du VWF sur les CMLVs en conditions pathologiques. Cette hypothèse est également supportée par les observations plus anciennes de la présence de VWF au niveau de vaisseaux pathologiques dans différents modèles animaux. Nous avons ainsi cherché à savoir quelles voies de signalisation activées par le VWF pouvaient être mises en jeu au niveau des CMLVs **11**.

Nous avons tout d'abord observé, dans un contexte d'athérosclérose au niveau d'aortes humaines, une colocalisation entre les CMLVs présentes dans la néo-intima et le VWF. De manière intéressante, la présence de VWF était très marquée dans la néo-intima et proportionnelle à l'atteinte du vaisseau (stries lipidiques ou lésions fibrolipidiques), mais aucun marquage n'a été observé dans la media. Une colocalisation similaire dans les vaisseaux pathologiques a été

observée au niveau de carotides. Pour évaluer au niveau fonctionnel les liens entre la migration et la prolifération des CMLVs et la présence concomitante de VWF dans les zones concernées, nous avons utilisé le modèle de ligature de l'artère carotide chez la souris. Cette expérience a été réalisée chez des souris contrôles et chez des souris déficientes en VWF. Un mois après la ligature, les carotides ont été prélevées, fixées et incluses en paraffine pour réaliser les marquages immuno-histologiques. De la même manière que pour les vaisseaux pathologiques humains, une colocalisation importante a été observée entre les cellules positives à l' α -SMA et le VWF dans la néo-intima. Cette colocalisation a aussi été associée à un marqueur de prolifération des cellules. Enfin, de manière identique aux tissus vasculaires humains, le VWF n'a pas été observé directement dans la media. Ces résultats ont ainsi confirmé la présence et l'accumulation de VWF dans les zones pathologiques riches en CMLVs proliférantes confirmant la possible interaction directe du VWF avec ces cellules.

In vitro, des CMLVs provenant d'aortes de donneurs sains (CMLs aortiques commerciales Lonza) ont été traitées avec des concentrations allant de 1 à 4 nM de VWF ou avec du PDGF, pour évaluer l'action proliférante du VWF, le PDGF étant ici utilisé comme un contrôle positif. Le VWF tout comme le PDGF sont capables d'augmenter de près de deux fois la prolifération des CMLVs. Avec le VWF, nous avons mis en évidence une activation des voies de signalisation d'Akt, p38-MAPK, ERK et Scr. Une activation a lieu dans les 15 à 20 minutes suivant la stimulation des cellules par le VWF. La voie STAT3 a également été testée mais n'est pas mise en jeu par le VWF.

Pour rechercher le récepteur impliqué dans la signalisation, nous avons examiné les récepteurs impliqués à la fois dans la liaison au VWF et présents au niveau des CMLVs. Nous avons ainsi identifié l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ **9** et pu observer la colocalisation de cette intégrine avec le VWF à la surface des CMLVs en microscopie confocale. Au niveau fonctionnel, l'ajout d'un siRNA contre la sous-unité α_v de l'intégrine lors du traitement avec le VWF inhibe totalement ses effets prolifératifs. Pour explorer plus en détail la signalisation dépendante de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, et en particulier sa liaison au VWF, nous avons ciblé le motif RDG présent en région C-terminale de l'intégrine puisque ce type de région pourrait lier directement le VWF. Un peptide inhibiteur (cRGDPV) et un anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$ (LM609) ont été testés. En présence comme en absence de VWF, le cRGDPV a inhibé de moitié la prolifération des CMLVs. En revanche, en présence de VWF, le LM609 n'a pas permis de modifier la capacité proliférative des CMLVs. Pour tester cette hypothèse, nous avons

utilisé un peptide RGT myristoylé (myr-RGT) empêchant la signalisation *outside-in* de la β_3 . La prolifération des CMLVs étant, là aussi, inhibée en présence de VWF et de myr-RGT, le concours de la signalisation provoquée par l' $\alpha_v\beta_3$ a bien été confirmé.

Compte tenu de l'absence d'inhibition obtenue avec le LM609, la question s'est posée d'une interaction directe ou non du VWF avec l' $\alpha_v\beta_3$. En effet, la présence de cet anticorps sur l' $\alpha_v\beta_3$ aurait dû empêcher le VWF de lier l'intégrine. Il était ainsi très probable qu'un autre récepteur lie le VWF et que ce soit ce récepteur qui engendre l'activation de la signalisation dépendante de $\alpha_v\beta_3$. Le récepteur LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*) étant connu pour lier $\alpha_v\beta_3$ et le VWF, nous avons testé la possible implication des récepteurs LRP en évaluant l'effet d'un inhibiteur général des LRP (GST-RAP). De manière intéressante, l'ajout de GST-RAP a permis d'inhiber l'effet prolifératif du VWF sur les CMLVs. Il est ensuite apparu que ce n'était pas le LRP1 qui était responsable de la liaison au VWF permettant son effet prolifératif. Une étude de la capacité du VWF à se lier aux LRP a permis de montrer une forte affinité entre le VWF et le LRP4. Parallèlement, le domaine A2 du VWF a été identifié comme étant le domaine liant le LPR. Ainsi, le traitement des CMLVs uniquement par le fragment A2 du VWF permet d'induire leur prolifération de manière similaire à du VWF sous sa forme entière.

Ce travail a ainsi permis de montrer la présence conjointe de VWF et de CMLVs dans la néo-intima d'artères pathologiques et que le VWF avait une fonction proliférative directe (Figure 3). Cette capacité du VWF à induire la prolifération des CMLVs est possible via sa liaison au récepteur LRP4 qui induira la transduction du signal par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

CONCLUSION

Les facteurs intervenants dans l'hémostase peuvent avoir des fonctions cellulaires éloignées de leurs rôles premiers. C'est le cas des facteurs de la coagulation capables d'acti-

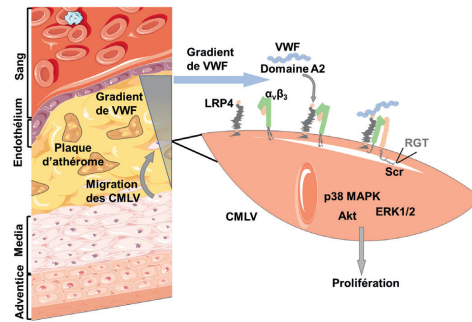


Figure 3 : Résumé de la signalisation dépendante de LRP4 et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ induisant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs).

Le facteur de von Willebrand (VWF) présent dans le sous-endothélium peut se lier au récepteur LRP4 présent à la surface des CMLVs. Ce dernier active l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui induira via SRC une signalisation conduisant à la prolifération des CMLVs.

Figure 3: Summary of signaling pathways related to LRP4 and $\alpha_v\beta_3$ integrin leading to vascular smooth muscle cells proliferation (CMLVs).

ver les récepteurs PARS. Le fait que le VWF pouvait lui aussi être étroitement lié à la physiopathologie vasculaire est soutenu depuis plusieurs dizaines d'années à la fois par des observations de tissus pathologiques, de modèles animaux, et par les complications observées chez les patients atteints de la maladie de Willebrand. Les voies de signalisations impliquées ont commencé à être identifiées et des fonctions complémentaires du VWF (notamment de transporteur de facteurs de croissance) ont été mises en évidence. L'identification des fonctions du VWF dans la physiopathologie de la paroi des vaisseaux pourrait permettre le développement de nouvelles thérapies modulant ses effets prolifératifs sur les CMLVs et donc le remodelage vasculaire. ■

POINTS CLÉS À RETENIR

- Plusieurs protéines de l'hémostase ont des fonctions cellulaires indépendantes de l'hémostase, en particulier sur les cellules composant la paroi vasculaire.
- Le VWF est présent au niveau du sous-endothélium, et est en contact avec les CMLVs en conditions pathologiques.
- Le VWF a des fonctions angiogéniques à la fois en induisant la migration des CMLVs et en apportant des facteurs de croissance.
- La liaison au récepteur LRP4 du VWF induit un signal prolifératif par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

RÉFÉRENCES

1. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 2015 ; 125 : 2019-28.
2. Duguid JB. The thrombogenic hypothesis and its implications. *Postgrad Med J* 1960 ; 36 : 226-9.
3. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen J, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996 ; 383 : 73-5.
4. Zannad F, Anker SD, Byra WM, Cleland JGF, Fu M, Gheorghide M, et al. Rivaroxaban in Patients with Heart Failure, Sinus Rhythm, and Coronary Disease. *N Engl J Med* 2018 ; 379 : 1332-42.
5. Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell* 1986 ; 46 : 185-90.
6. Bosmans JM, Kockx MM, Vrints CJ, Bult H, De Meyer GR, Herman AG. Fibrin(ogen) and von Willebrand factor deposition are associated with intimal thickening after balloon angioplasty of the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 ; 17 : 634-45.
7. De Meyer GR, Hoylaerts MF, Kockx MM, Yamamoto H, Herman AG, Bult H. Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 ; 19 : 2524-34.
8. Schepcke L, Murphy EA, Zarpellon A, Hofmann JJ, Merkulova A, Shields DJ, et al. Notch promotes vascular maturation by inducing integrin-mediated smooth muscle cell adhesion to the endothelial basement membrane. *Blood* 2012 ; 119 : 2149-58.
9. Denis C, Williams JA, Lu X, Meyer D, Baruch D. Solid-phase von Willebrand factor contains a conformationally active RGD motif that mediates endothelial cell adhesion through the alpha v beta 3 receptor. *Blood* 1993 ; 82 : 3622-30.
10. Ishihara J, Ishihara A, Starke RD, Peghaire CR, Smith KE, McKinnon TAJ, et al. The heparin binding domain of von Willebrand factor binds to growth factors and promotes angiogenesis in wound healing. *Blood* 2019 ; 133 : 2559-69.
11. Lagrange J, Worou ME, Michel JB, Raoul A, Didelot M, Muczynski V, et al. The VWF/LRP4/ $\alpha_v\beta_3$ -axis represents a novel pathway regulating proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2021 ; doi:10.1093/cvr/cvab042.

4.4 La coagulation

La coagulation est une étape importante de l'hémostase pour aboutir à la formation d'un caillot sanguin. L'étape de coagulation est initiée via deux voies : l'une extrinsèque qui est dépendante du facteur tissulaire (FT) et l'autre intrinsèque dépendante du facteur XII (FXII). La cascade de coagulation démarre avec la voie du FT²⁰. Le facteur VII (FVII) et le facteur VII activé (FVIIa) sont exposés au FT à la surface des cellules sous-endothéliales à la suite d'une lésion. Le complexe FT : FVIIa se forme et va activer le facteur X (FX) en FXa²¹. L'initiation de la cascade de coagulation est inhibée par la voie du facteur tissulaire (TFPI). Le FXa va se lier à son cofacteur le FVa. Ce complexe va cliver la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). La thrombine est l'enzyme clé de la coagulation. La thrombine va convertir par protéolyse la protéine C en une puissante enzyme anti-coagulante (PCa). La thrombine convertit ensuite le fibrinogène soluble en fibrine insoluble. La coagulation peut également être initiée via la voie intrinsèque²². Cette voie rentre en jeu lorsque le FXIII subit une auto-activation causée par un changement conformationnel pour générer du FXIIa. Le FXIIa va ensuite convertir la prékallikréine en kallikréine qui va à son tour générer plus de FXIIa sous forme d'amplification par retro-activation²³. Lorsque la coagulation est dérégulée et suractivée, cela peut entraîner des thromboses. Pour éviter cela, en condition normale, l'excès de facteurs est dispersé dans le flux sanguin. Ainsi la coagulation se cantonne au thrombus. L'antithrombine est l'inhibiteur le plus puissant de la coagulation. Elle est capable d'inhiber tous les facteurs qui ont été activés (*figure 4*).

4.5 La fibrinolyse

La fibrinolyse est la phase finale de l'hémostase. Cette phase va permettre d'éliminer la fibrine et de détruire le caillot qui a été formé²⁴. Cette lyse est possible grâce à une protéase appelée plasmine. Cette dégradation du caillot de fibrine va produire les D-dimères.

Le plasminogène synthétisé par les hépatocytes est converti en plasmine au niveau du thrombus par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). La sécrétion du t-PA est activée par l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA). L't-PA et u-PA sont inhibés par des inhibiteurs de l'activateur du plasminogène PAI-1 et PAI-2²⁵ (*figure 4*).

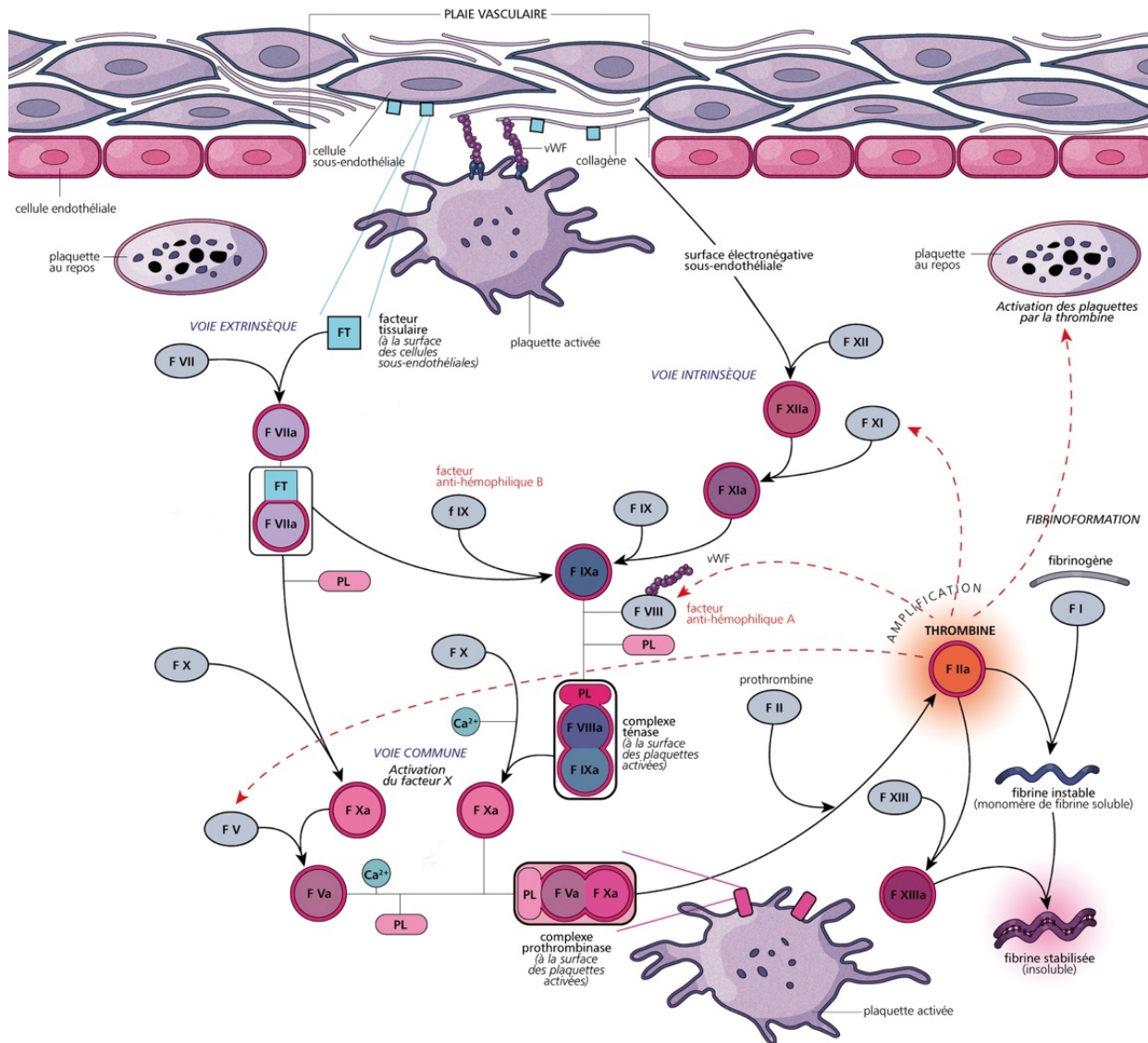


Figure 4 : Schéma de la cascade de coagulation (La filière des maladies hémorragiques constitutionnelles MHEMO <https://mhemofr/>)

Lors d'une lésion vasculaire, le TF est relargué et provoque l'activation du FVIIa et du FXa. Le FXa active le FII (prothrombine) en FIIa (thrombine) et cette thrombine va étendre sa propre formation par l'activation du FV, du FVIII et du FXI. Le FXIa peut activer le FIXa et va activer le FX avec l'aide du FVIIIa. La thrombine va cliver le fibrinogène et entraîner la formation de fibrine insoluble. Le caillot de fibrine est ensuite stabilisé par le FXIIIa. La lyse du caillot est ensuite possible avec l'aide de la conversion du plasminogène en plasmine via l't-PA et l'u-PA.

4.6 La thrombose

La thrombose est une complication des maladies cardiovasculaires et des maladies inflammatoires et cause environ 15 000 décès par an en France. La thrombose correspond à la formation d'un caillot sanguin (thrombus) au sein du réseau veineux ou artériel.

Une thrombose pathologique est observée lors d'une dérégulation d'un ou plusieurs facteurs composant la Triade de Virchow²⁶ : la coagulation (hypercoagulabilité), l'altération

endothéliale et les variations hémodynamiques (stase sanguine) (*figure 5*). Elle peut également être la conséquence d'une fibrinolyse incomplète.

Récemment, il a été mis en évidence un autre mécanisme qui amplifie les thromboses : l'inflammation ^{27,28}. D'autres facteurs comme le tabagisme, la chirurgie ou la prise de contraceptifs oraux contribuent à l'augmentation du risque de thrombose. La physiopathologie de la thrombose artérielle ainsi que de la thrombose veineuse sont différentes. Leur origine et la façon dont elles sont traitées sont différentes également.

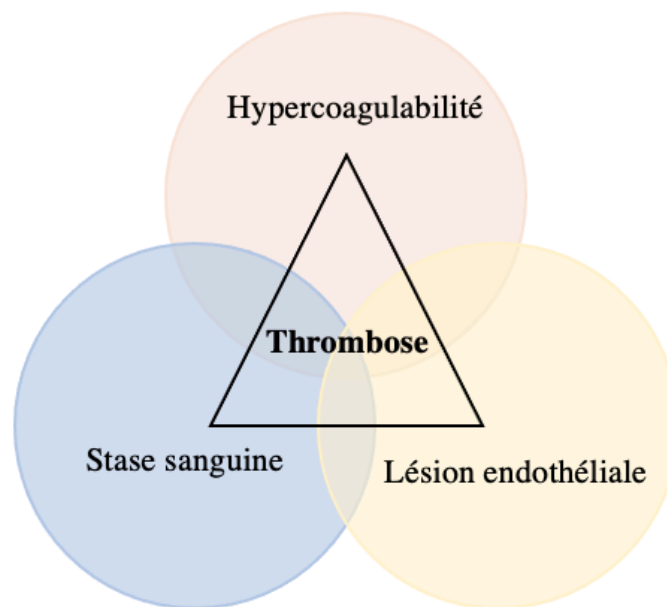


Figure 5 : Schéma de la triade de Virchow

4.6.1 La thrombose artérielle

L'élément déclencheur d'une thrombose artérielle est le plus souvent la rupture d'une plaque d'athérosclérose dans l'artère (*figure 6A*). Lorsque cette plaque se rompt, les plaquettes sont mobilisées ²⁹. Rapidement le thrombus plaquettaire (qui est pathologique en comparaison du clou plaquettaire) va grossir et activer la cascade de coagulation en induisant la formation de fibrine dans le thrombus.

Une augmentation du facteur tissulaire chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires est mesurée et cette augmentation pourrait contribuer à accroître le risque de thrombose après rupture de la plaque ³⁰. Les thromboses artérielles sont prévenues grâce à des médicaments ciblant les plaquettes (exemple : l'aspirine) évitant leur agrégation et leur accumulation sur la plaque d'athérome ³¹.

4.6.2 La thrombose veineuse

La thrombose veineuse profonde survient dans les grosses veines des membres inférieurs (*figure 6B*). L'embolie pulmonaire est une complication de la thrombose veineuse. Elle résulte d'un détachement d'une partie du thrombus qui migre vers les poumons et s'installe dans une artère pulmonaire où le flux sanguin est perturbé ³¹. Le thrombus formé lors de la thrombose veineuse est riche en fibrine et en globules rouges (thrombus rouge) alors que le thrombus artériel est riche en plaquettes (thrombus blanc). Une thrombose veineuse apparaît après un changement dans la composition du sang (hyperviscosité, déficience en antithrombine, thrombophilie ou encore syndrome nérotique) qui aura un impact sur le flux sanguin en le ralentissant ²⁶. Comme pour la thrombose artérielle, une augmentation du facteur tissulaire pourrait déclencher une thrombose veineuse ^{32,33}. L'endothélium régule l'adhésion et la migration des leucocytes à sa surface et produit des cytokines et chimiokines. Il va être responsable de l'adhésion et l'activation des plaquettes et de la cascade de coagulation. Lors de son altération, l'endothélium devient procoagulant en libérant des molécules procoagulantes comme le facteur VWF qui va former des multimères à la surface des cellules endothéliales ³⁴. A l'inverse, en condition physiologique, un endothélium intact va prévenir le risque de thrombose en exprimant des molécules anticoagulantes comme le TFPI ou encore la thrombomoduline ³⁵.

Cette thrombose est traitée avec des médicaments anti-coagulants (exemple : l'héparine, les anti-vitamine K ou les anti-coagulants oraux directs). Le désavantage de ces médicaments est qu'ils augmentent les saignements et le risque hémorragique.

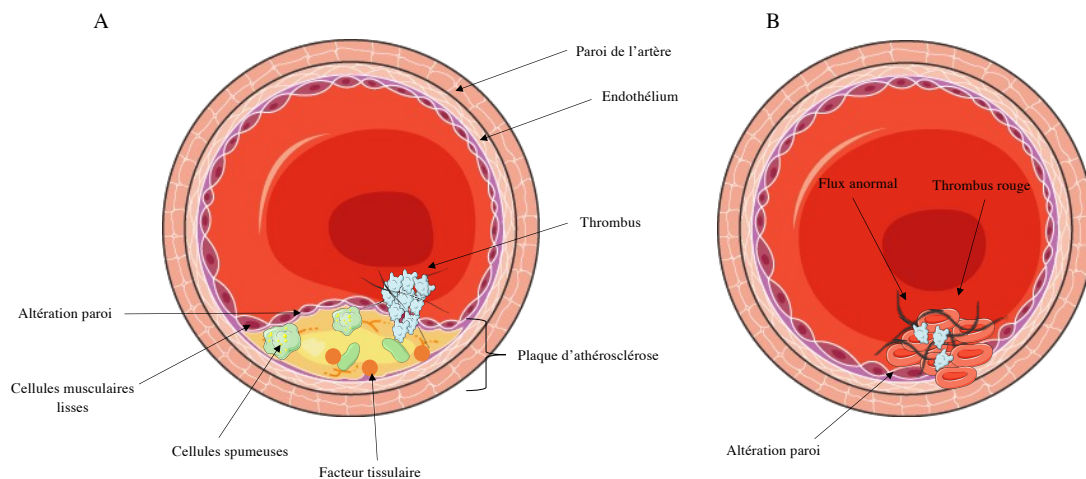


Figure 6 : Schéma d'une thrombose artérielle et d'une thrombose veineuse d'après Mackman, Nature 2008

Le déclenchement de la thrombose artérielle est la rupture de la plaque d'athérome. L'endothélium est altéré et les composants de la plaque se propagent dans la lumière du vaisseau sanguin (A). Dans la thrombose veineuse l'endothélium devient procoagulant et est altéré. Le flux sanguin est diminué (B).

4.6.3 L'immunothrombose

L'immunothrombose est définie comme un processus physiologique décrit il y a quelques années, permettant de limiter la diffusion des pathogènes dans l'organisme grâce aux actions conjointes de l'hémostase et des cellules immunitaires ²⁷. Elle a d'abord été décrite dans des pathologies telles que le sepsis et récemment dans la COVID-19 ²⁸.

Lors de cette immunothrombose, différents acteurs entrent en jeu. Tout d'abord, l'adhésion des monocytes à l'endothélium et leur activation entraînent la sécrétion de FT et le déclenchement de la cascade de coagulation. L'activation des neutrophiles aboutit à la sécrétion de pièges extracellulaires constitués d'acide désoxyribonucléique (ADN) et d'histone, les « NETs ». Les NETs vont être capables de se lier au facteur VWF, ce qui conduit à l'activation des plaquettes et vont participer à la formation du thrombus (*figure 7*).

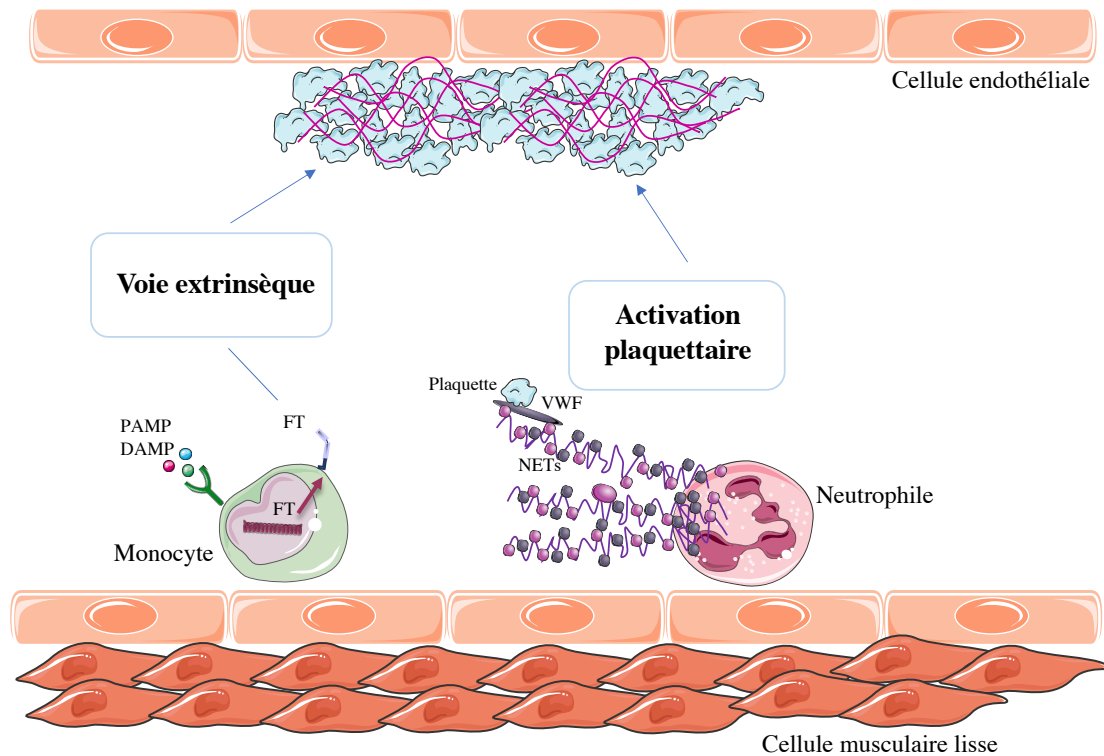


Figure 7 : Schéma de l'immunothrombose

Les cellules immunitaires ont développé des voies prothrombotiques pour protéger les hôtes en réponse aux motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) ou aux motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP). Les monocytes expriment et délivrent le facteur tissulaire activé aux sites d'exposition aux agents pathogènes, ce qui initie la voie extrinsèque de la coagulation. Les NETs se lient au facteur VWF et entraînent l'activation plaquettaire. Le microthrombus se forme pour empêcher la dissémination des agents pathogènes. Dès que cette immunothrombose est exacerbée, elle laisse part à une thromboinflammation.

Ce qu'il faut retenir :

Hémostase et thrombose

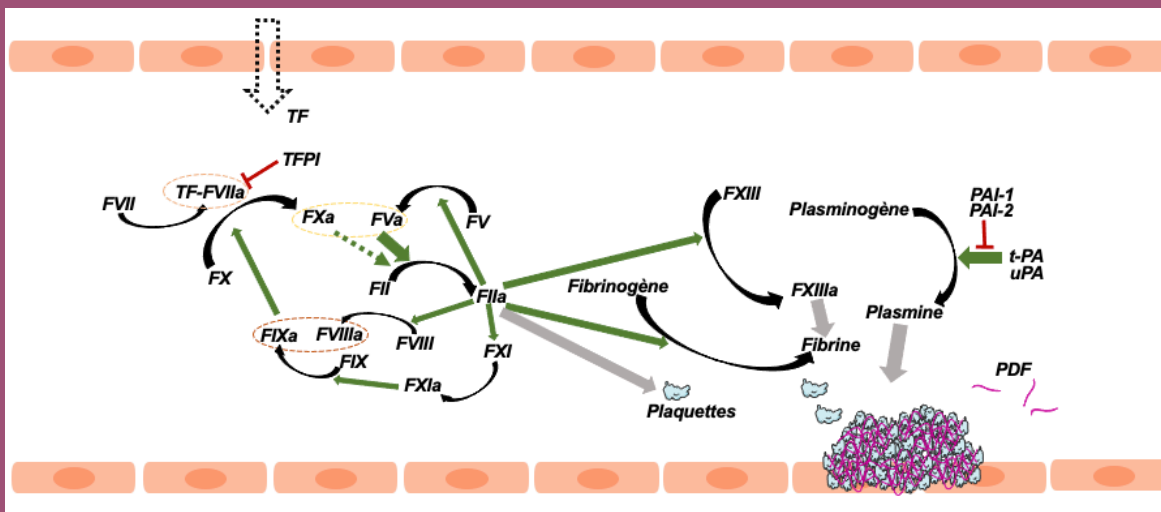
Rôle des plaquettes dans l'hémostase : roulement, activation, agrégation

1^{ère} étape l'hémostase primaire : formation du clou plaquettaire

2^{ème} étape l'hémostase secondaire : formation du caillot de fibrine

3^{ème} étape la fibrinolyse

Formation de thrombose pathologique due à une hypercoagulabilité, à des altérations endothéliales et à des variations hémodynamiques



Dans ce qui précède, nous avons vu que les maladies inflammatoires aggravent le risque de développer des maladies cardiovasculaires ainsi que des thromboses. Pour étayer nos propos, nous avons choisi les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

5. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comprennent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Selon l'association François Aupetit, les MICI touchent environ 250 000 personnes en France et 3 millions de personnes en Europe.

Les MICI se caractérisent par une inflammation du tractus gastro-intestinal. Ces maladies sont dites chroniques. Tout au long de la vie, les patients ont des périodes de rechute et des périodes de rémission. Dans les cas les plus graves, la chirurgie permet de retirer les zones les plus lésées³⁶. Les MICI sont principalement diagnostiquées entre 15 et 30 ans, mais peuvent survenir à tout âge.

5.1 La maladie de Crohn

La MC peut affecter l'ensemble du tractus gastro-intestinal, de la bouche à l'anus, mais plus communément l'iléon et le côlon, ou deux segments connus sous le nom de lésions iléo-coliques, sont les plus touchés³⁷. Bien que la maladie touche les hommes et les femmes de tous âges, le diagnostic est généralement posé entre 15 et 30 ans.

Le plus souvent, les symptômes de la maladie sont intestinaux : douleurs abdominales, diarrhées et selles sanglantes. Ces symptômes sont variables et se manifestent par des poussées et des rémissions de l'inflammation. Avec un traitement approprié, les périodes de rémission peuvent durer des années.

5.2 La rectocolite hémorragique

La principale différence entre RCH et MC est la localisation de l'atteinte du système digestif. La rectocolite a tendance à montrer des dommages au niveau du côlon et au rectum. Par exemple, les sections de l'intestin grêle ne sont pas affectées dans la RCH (*figure 8*). Semblable à la MC, la maladie se développe par poussées entrecoupées de périodes de rémission. Les symptômes de la RCH sont des saignements rectaux, des pertes anales, des douleurs abdominales et des diarrhées³⁸.

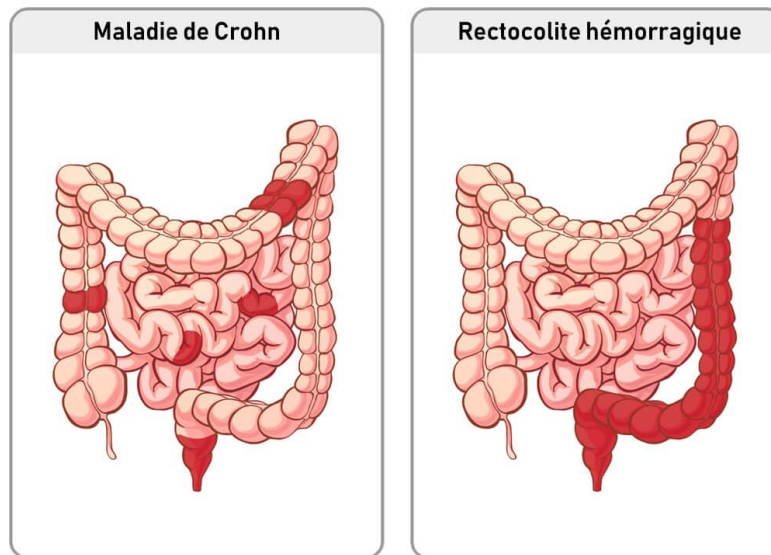


Figure 8 : Atteinte de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique

La maladie de Crohn provoque plutôt des atteintes multisites allant de la bouche à l'anus alors que la rectocolite est localisée au niveau du colon et du rectum.

5.3 Prise en charge et traitements

Le dépistage est actuellement effectué sur la base des signes cliniques. Le patient consulte son médecin traitant puis un gastro-entérologue et une série de tests est réalisée : une coloscopie est effectuée pour rechercher des dommages, des questionnaires de vie, des tests sanguins ou encore le dosage de la calprotectine fécale. La calprotectine est une protéine antimicrobienne produite par les neutrophiles. Son dosage permet de faire la différence entre une MICI et un syndrome du côlon irritable ³⁹.

Un score clinique est calculé grâce à l'indice de Harvey-Bradsham pour la MC ⁴⁰ et le score de Mayo pour la RCH ⁴¹.

Au Centre hospitalier régional universitaire (CHRU) de Nancy a été développé un index histologique pour évaluer l'activité histologique de la maladie dans la RCH ⁴². Ces scores permettent d'évaluer l'intensité de la maladie : inactive, faible, modérée, sévère.

En termes de traitement, plusieurs sont actuellement disponibles sur le marché. L'immunomodulateur, l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA) est utilisé en traitement standard dans la RCH. De nombreuses études cliniques ont montré l'efficacité du 5-ASA comme traitement d'induction ^{43,44}. Les corticostéroïdes (prednisolone) sont utilisés chez des patients RCH en échec de réponses au 5-ASA. Les anti-inflammatoires ciblant des facteurs de nécrose tumorale (TNF)(influximab) ⁴⁵, les anti-intégrines avec les anti- $\alpha_4\beta_7$ (védolizumab) ⁴⁶, et les anti-interleukines avec les anti-IL12/IL23 sont utilisés dans la RCH et dans la MC ⁴⁷. Les anti-Janus

Kinase (anti-JAK) sont utilisés dans la RCH ⁴⁸. Tous ces traitements bloquent l'inflammation et les mécanismes inflammatoires qui sont altérés.

La chirurgie reste fréquente au cours des MICI. Elle n'est pas utilisée en première intention. Elle a lieu si les patients ne répondent pas aux traitements ou en cas de complications (abcès, fistules) dans l'intestin ⁴⁹.

5.4 Physiopathologie

La MC et la RCH sont deux maladies dont l'étiologie est multifactorielle. On n'en connaît pas aujourd'hui l'origine et/ou les causes. Cependant, certains facteurs tels qu'une prédisposition génétique, un déséquilibre du microbiote intestinal avec une barrière intestinale altérée, une dérégulation immunitaire ou des facteurs environnementaux font partie de la physiopathologie des MICI.

5.4.1 Facteurs environnementaux

La prévalence des MICI augmente chaque année. Le changement d'environnement impacte l'apparition de MICI. Des populations migratoires sans antécédents de MICI voient leur risque de développer une MICI augmenter en arrivant dans un pays occidental industrialisé ⁵⁰.

Le tabagisme est le premier facteur environnemental qui affecte les MICI ⁵¹. Il module le système immunitaire via la nicotine et la fumée de cigarette ⁵². Le tabac a deux effets : pour la MC, celui-ci est délétère et augmente le risque de maladie, de recours à la chirurgie ou encore de complications cardiovasculaires ³⁷. Pour la RCH, le tabac est bénéfique car il diminue la perméabilité membranaire et augmente la production du mucus au niveau colique ^{53,54}. D'autres facteurs environnementaux impactent la survenue de MICI : le stress, l'alimentation, la pollution, les contraceptifs ou encore les médicaments ⁵⁵.

5.4.2 Facteurs génétiques

Une personne a plus de risque de développer une MICI si elle possède des antécédents familiaux de MICI ⁵⁶. Le gène NOD2 (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2) a été identifié comme étant associé aux prédispositions génétiques des MICI ⁵⁷. D'autres gènes avec différentes fonctions biologiques ont été identifiés. Des gènes impliqués dans la barrière épithéliale, le recrutement des cellules immunitaires, la migration cellulaire, l'autophagie (mécanisme de dégradation lysosomale pour éliminer les éléments indésirables introduits dans la cellule) ou encore le stress oxydatif (agression des cellules par des radicaux libres : espèces réactives de l'oxygène) jouent un rôle dans le développement d'une MICI ³⁶.

5.4.3 Microbiote intestinal

Le microbiote intestinal représente la flore intestinale. La flore intestinale est composée de nombreuses bactéries, virus et champignons non pathogènes qui sont présents dans notre tube digestif (intestin grêle et colon).

De nombreuses études montrent une dysbiose intestinale chez les patients MICI^{58,59}. La composition du microbiote est influencée par différents facteurs : la prise d'antibiotiques, la génétique, l'alimentation et l'inflammation intestinale^{60,61}. Les 3 principales classes de bactéries intestinales sont : *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Bacteroidetes*. Le microbiote de patients MICI connaît une baisse de *firmicutes* et *bacteroidetes* par rapport à des témoins sains⁶². De nombreuses études de séquençage ont permis de connaître en détail le microbiote intestinal de patients MICI par rapport au microbiote intestinal de sujets sains^{60,61,63} (figure 9).

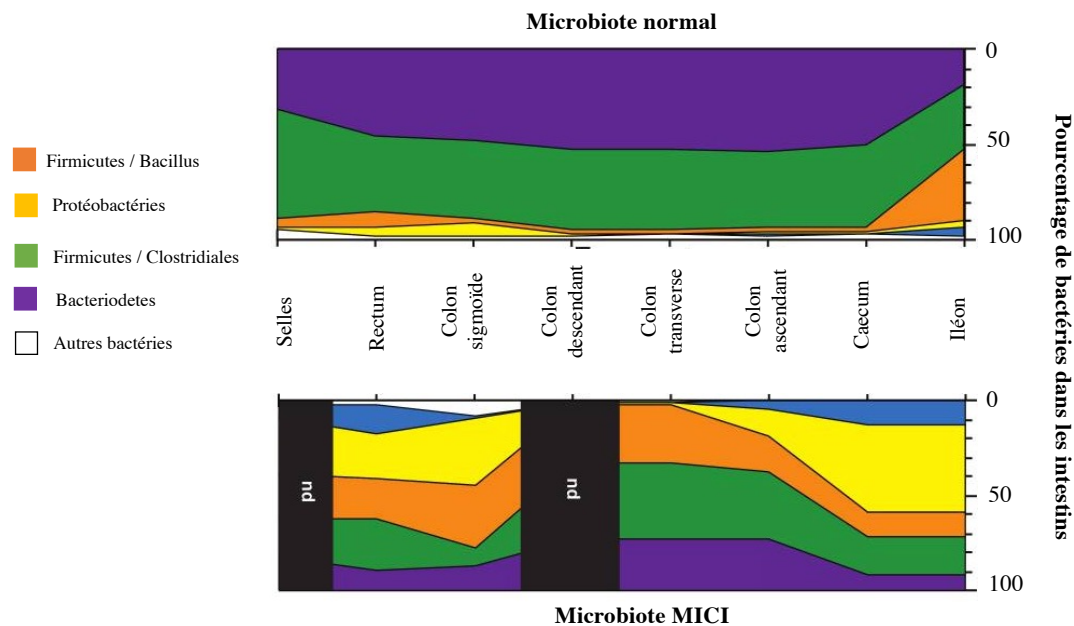


Figure 9 : Comparaison d'un microbiote normal et d'un microbiote de MICI d'après Peterson et al.2008⁶⁴

Approche métagénomique comportant 5405 patients atteints de MICI et 13 000 témoins. Le schéma représente toutes les bactéries présentes dans le tractus digestif allant de l'iléon jusque dans les selles. Ce sont majoritairement les familles des firmicutes et des bacteroidetes qui connaissent le plus de modifications.

5.5 Risque de thrombose dans les MICI

Il a été démontré que les patients atteints de MICI sont plus à risque de thrombose que la population générale ⁶⁵. Ce risque augmente de 60 % par rapport à la population générale. 80 % des thromboembolies veineuses surviennent chez des patients en phase active et chez des patients hospitalisés ⁶⁶. Après un premier événement de thrombose, les patients ont plus de risques de récurrence et de faire d'autres événements thrombotiques ⁶⁷. La prévalence du risque accru de thrombose est multifactorielle. Ce risque va dépendre de l'activité de la maladie, d'une chirurgie récente, d'une dérégulation du système immunitaire mais également d'une dérégulation dans la cascade de coagulation ^{68,69}. En raison du risque augmenté de thrombose lors d'une hospitalisation, les patients reçoivent une prophylaxie pharmacologique pour réduire le risque. L'héparine de bas poids moléculaire est recommandée par rapport à l'héparine non fractionnée à faible dose ⁷⁰.

Les traitements pourraient également contribuer au risque de thrombose ^{71,72}. Il est à noter que les traitements actuels des MICI par des anti-inflammatoires agissent sur l'inflammation mais pas sur le versant « thrombotique ».

Les stéroïdes, utilisés pour réduire l'inflammation, sont dans le même temps associés à un risque accru de thrombose. Une étude clinique allant de 2003 à 2009 incluant 15 100 patients a montré 335 événements thrombotiques chez des patients MICI prenant des corticostéroïdes ou une combinaison biologique : anti-TNF α avec corticostéroïdes ⁷³.

Les anti-JAK sont également associés à un risque accru de thrombose. Cette association a d'abord été décrite dans la polyarthrite rhumatoïde ⁷⁴.

A l'opposé des stéroïdes et des anti-JAK, les anti-TNF α peuvent être associés à une diminution du risque de thrombose chez les patients. Une étude sur 103 patients MICI et 113 témoins a montré que des patients sous anti-TNF α retrouvent un profil normal de leur processus de fibrinolyse ⁷⁵. Une autre étude comparant les corticostéroïdes et les anti-TNF α sur 547 patients hospitalisés montre que les anti-TNF α étaient associés à un risque réduit d'événement thrombotique ⁷⁶. La thromboembolie veineuse est un risque provoqué chez les patients MICI sous anti-JAK. Mais d'autres études chez les patients RCH sont nécessaires pour évaluer pleinement le risque des anti-JAK ^{71,72}.

Résumé de la revue abordant les mécanismes impliqués dans la thrombose chez les MICI :

Cette revue présente la littérature actuelle pour mettre en lumière les mécanismes impliqués dans l'augmentation du risque thrombotique chez les patients MICI. La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) se différencient par la zone d'atteinte. Dans la MC, la totalité du tube digestif peut être touché alors que dans la RCH l'atteinte est principalement au niveau du colon et du rectum.

Le risque thrombotique est augmenté chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin. De nombreuses complications sont observées chez ces patients comme une thromboembolie veineuse, une embolie pulmonaire ou encore une ischémie mésentérique. Plusieurs modifications hémostatiques sont associées au risque de thrombose chez les patients atteints de MICI. Ces patients auront une augmentation de leur numération plaquettaire et une diminution du volume plaquettaire moyen (VPM). Les marqueurs de l'activation *in vivo* de la cascade de coagulation sont tous augmentés. Ces patients ont une génération de thrombine qui est augmentée. Un article récent a montré que les patients traités par un anti-TNF α avec une phase de rémission ont une diminution de la génération de thrombine avec des niveaux proches de ceux de personnes contrôles. Le fibrinogène est également augmenté. La fibrinolyse semble aussi être altérée chez ces patients avec des temps de lyse du caillot prolongés.

Les données sur le risque de thrombose chez les patients MICI ont fait récemment l'objet d'un consensus sur le plan clinique et la prévention des accidents thrombotiques chez ces patients a été publiée dans Nature reviews gastroenterology and hepatology en 2021 ⁷⁷.

Mécanismes moléculaires thrombotiques au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Thrombotic molecular mechanisms in chronic inflammatory bowel diseases

Célia Schellenberg¹
Véronique Regnault¹
Laurent Peyrin-Biroulet^{2,3}
Patrick Lacolley¹
Jérémy Lagrange^{1,2}

¹ Université de Lorraine, Inserm, DCAC, 9 avenue de la forêt de Haye 54 505 Vandœuvre-lès-Nancy

² CHRU, Nancy

³ Université de Lorraine, Inserm, NGERE, Nancy

Correspondance : C. Schellenberg
celia.schellenberg@univ-lorraine.fr

▼ Résumé

Le risque thrombotique est augmenté chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (MICI). Plusieurs modifications des cellules sanguines et des molécules impliquées dans l'hémostase ont été décrites au cours des MICI. Les patients atteints de MICI présentent, par exemple, une augmentation du nombre de plaquettes ainsi qu'une augmentation des vésicules extracellulaires dérivées des plaquettes. La coagulation est en général activée comme le montrent les marqueurs *in vivo* d'activation de la coagulation, et la fonction anticoagulante des cellules endothéliales est altérée. Enfin, le fibrinogène est augmenté et le caillot de fibrine est plus dense. Cependant, même si le tableau clinique évoque un déséquilibre vers un état procoagulant, les mécanismes de la thrombose associée aux MICI sont différents de ceux de la population générale. Les patients atteints de MICI présentent des particularités par rapport aux paramètres traditionnels associés à un risque thrombotique augmenté. Celles-ci expliquent que les traitements à la fois préventifs et curatifs sont loin de faire l'unanimité entre les spécialistes de la coagulation et des MICI. Le but de cette revue est de synthétiser les connaissances sur les altérations de la coagulation aussi bien sur les versants pro-, et anticoagulants associés aux MICI.

• **Mots clés** : maladie inflammatoire chronique de l'intestin, thrombose, plaquettes, fibrinolyse

▼ Abstract

The risk of thrombosis is increased in patients with inflammatory bowel disease (IBD). Several changes in blood cells and molecules involved in hemostasis have been described in IBD. For example, IBD patients have an increase in platelets and an increase in platelet-derived extracellular vesicles. Coagulation is generally activated as shown by in vivo markers of coagulation activation, and the anticoagulant function of endothelial cells is impaired. Finally, fibrinogen is increased and the fibrin clot is denser. However, even if the clinical picture suggests an imbalance towards a procoagulant state, the mechanisms of thrombosis associated with IBD are different from those of the general population. Patients with IBD have particularities with respect to the traditional parameters associated with an increased thrombotic risk. These explain why both preventive and curative treatments are far from unanimity among coagulation and IBD specialist's opinion. The aim of this review is to synthesize the current knowledge on coagulation alterations on both the pro- and anti-coagulant sides associated with IBD.

• **Key words**: inflammatory bowel disease, thrombosis, platelet, fibrinolysis

Pour citer cet article : Schellenberg C, Regnault V, Peyrin-Biroulet L, Lacolley P, Lagrange J. Mécanismes moléculaires thrombotiques au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Hépatogastro et Oncologie Digestive 2022 ; xx : 1-7. doi : 10.1684/hpg.2022.2464

Introduction

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comprennent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Ces maladies sont des facteurs de risque indépendants de premier événement et de récurrence d'événements de thromboses veineuses ou d'embolies pulmonaires. Les études de populations ont montré une augmentation du risque de maladie thromboembolique veineuse (MTEV) dans les MICI comparés à la population générale. Le risque de MTEV est plus de deux fois plus élevé chez les patients atteints de MICI [1] et quel que soit le stade de la maladie et les traitements proposés.

Après la survenue d'un premier événement de MTEV, la probabilité de récurrence à 5 ans après l'arrêt du traitement anticoagulant est dans tous les cas plus élevée chez les patients atteints de MICI par rapport à la population générale [2]. De plus, la sévérité de la maladie est également un facteur de risque indépendant de survenue de thrombose. Un patient en phase active aura un risque de thrombose plus important qu'un patient en phase inactive.

D'autres événements thrombotiques plus sévères ont également une prévalence augmentée chez ces patients telles que les thromboses artérielles touchant plusieurs territoires (infarctus du myocarde, ischémies mésentériques, embolie pulmonaire et accidents vasculaires cérébraux) [3].

Dans cette revue, nous analyserons les principales altérations cellulaires et moléculaires de l'hémostase (plaquettes, coagulation, fibrinolyse) et leurs associations étroites avec les anomalies immuno-inflammatoires qu'elles soient engendrées par la maladie et ou induites par les traitements.

Implication des plaquettes dans les MICI

L'augmentation de la numération plaquettaire dans les MICI correspond à une thrombocytose réactionnelle décrite pour la première fois il y a une cinquantaine d'années [4]. Dans les modèles murins de MICI tels que celui au dextran sulfate de sodium (DSS), la numération plaquettaire ainsi que le renouvellement des plaquettes sont augmentés. Les plaquettes sont également plus actives et s'agrègent plus facilement aux cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes ou encore lymphocytes) [5].

/// L'augmentation de la numération plaquettaire dans les MICI correspond à une thrombocytose réactionnelle ///

Le volume plaquettaire moyen (VPM) est également diminué et corrélé à l'activité de la maladie. Les

hypothèses expliquant la diminution du VPM sont (i) la diminution de la demi-vie par l'inflammation entraînant une augmentation de la vitesse de production (les plaquettes produites étant plus petites) ou (ii) une consommation des plus grosses plaquettes (connues pour être plus actives) au niveau des sites inflammatoires, ce qui entraîne une diminution de la taille moyenne des plaquettes en circulation.

La fonction plaquettaire, l'activation et l'agrégation sont également augmentées avec l'activité de la maladie [6]. Le facteur plaquettaire 4 (PF4) qui est un marqueur de l'activation plaquettaire (sécrétion des granules α) est augmenté dans les MICI et cette augmentation est également corrélée à l'activité de la maladie [7]. Les récepteurs à la thrombine, les récepteurs activés par les protéases (PAR)-1 et -4 participent à l'activation plaquettaire dans la MC [8]. Le facteur von Willebrand (VWF) peut aussi influencer la réactivité plaquettaire dans les MICI. Ce facteur est principalement synthétisé par les cellules endothéliales (CE) et par les mégacaryocytes. Il est impliqué dans la formation du thrombus via sa capacité à transporter le facteur VIII (FVIII) et à participer à l'activation et l'adhésion plaquettaire par l'intermédiaire du récepteur plaquettaire glycoprotéine (GP) Iba. Le taux de VWF circulant est augmenté dans les MICI et la métalloprotéase participant à sa dégradation (ADAMTS 13) est diminuée [9].

De nouveaux rôles ont été attribués aux plaquettes en particulier dans l'inflammation. Elles contribuent à l'inflammation en interagissant avec les cellules immunitaires et les cellules de la paroi vasculaire. L'activation des plaquettes aboutit à la fois au relargage des molécules inflammatoires (VWF, fibrinogène) contenues dans les granules α et à l'expression membranaire de récepteurs de l'inflammation [5].

/// L'activation des plaquettes aboutit à la fois au relargage des molécules inflammatoires (facteur von Willebrand, fibrinogène) contenues dans leurs granules α et à l'expression membranaire de récepteurs de l'inflammation ///

Chez la souris traitée au DSS, l'activation de certains récepteurs plaquettaires est augmentée (en particulier la glycoprotéine IIb/IIIa ou GPIIb/IIIa), et notamment ceux permettant leur liaison aux leucocytes et leur adhésion à d'autres surfaces cellulaires [10, 11]. Malgré le grand nombre d'études cliniques réalisées sur les inhibiteurs de GPIIb/IIIa, aucune n'a été faite dans les MICI. Puisque certaines molécules ciblant les intégrines, notamment l'intégrine $\alpha_4\beta_7$, qui limite le trafic des cellules immunitaires, se sont montrées bénéfiques dans les MICI, d'autres anti-intégrines, dirigés en particulier contre celles impliquées dans le risque thrombotique telles que GPIIb/IIIa pourraient aussi présenter un intérêt thérapeutique dans les MICI.

▄▄ **Les patients atteints de MICI ont une nette augmentation de la numération plaquettaire et une diminution du volume plaquettaire moyen avec une réactivité plus élevée qui pourrait participer à l'augmentation du risque thrombotique** ▄▄

Les altérations de la coagulation

La transformation de la prothrombine en thrombine est l'étape clé de la coagulation. Elle conduit à la conversion de fibrinogène en fibrine et la formation d'un caillot. Les marqueurs de l'activation *in vivo* de la cascade de coagulation sont tous augmentés dans les MICI en phases actives : complexes thrombine-antithrombine (TAT), fragments 1+2 de la prothrombine (F1+2) [12]. Les D-dimères sont un marqueur à la fois de l'activation de la coagulation et de la fibrinolyse. Leur importance a récemment été montrée dans les complications thrombotiques de l'infection par la Covid-19 qui présente des similitudes avec les changements de coagulation et la réponse inflammatoire dans les MICI. Bien que les résultats montrés varient, la grande majorité des études ont montré une augmentation des concentrations circulantes en D-dimères dans les MICI [12].

▄▄ **Les marqueurs de l'activation *in vivo* de la cascade de coagulation sont tous augmentés dans les MICI en phases actives** ▄▄

Concernant la génération de thrombine mesurée *in vitro* en plasma sans plaquettes par la méthode CAT (*calibrated automated thrombography*), celle-ci n'est pas différente excepté après l'ajout de thrombomoduline (TM) et ce uniquement chez les patients en phase très active [13]. La TM est présente à la surface des cellules endothéliales où elle exerce une activité anticoagulante en permettant l'activation de la protéine C activée (PCa) par la thrombine. L'ajout de TM dans le test permet ainsi d'évaluer le système anticoagulant de la protéine C activée en l'absence de cellules endothéliales. Chez de jeunes patients et indépendamment de l'échelle de gravité) une augmentation de la génération de thrombine a été observée, le tout corrélé à l'activité de la maladie. Un article récent portant sur les variations de génération de thrombine chez les patients traités avec un anti-TNF- α (infliximab) [14] a de façon paradoxale montré qu'un traitement anti-TNF- α pendant 22 semaines s'accompagnait d'une baisse de la génération de thrombine chez les patients atteints de MICI. Dans le même article, les taux de FVIII, de VWF et du fibrinogène étaient diminués de façon significative à la suite de ce traitement avec des valeurs se rapprochant de celles des personnes contrôles comme pour la génération de thrombine.

Le facteur tissulaire (FT), déclencheur de la cascade de la coagulation (figure 1), exerce une fonction délétère dans les modèles expérimentaux de colite [15]. L'utilisation d'anticorps dirigés contre le FT dans le modèle au DSS ou chez des souris synthétisant très peu de FT (1 % de la concentration normale) entraîne une diminution de la

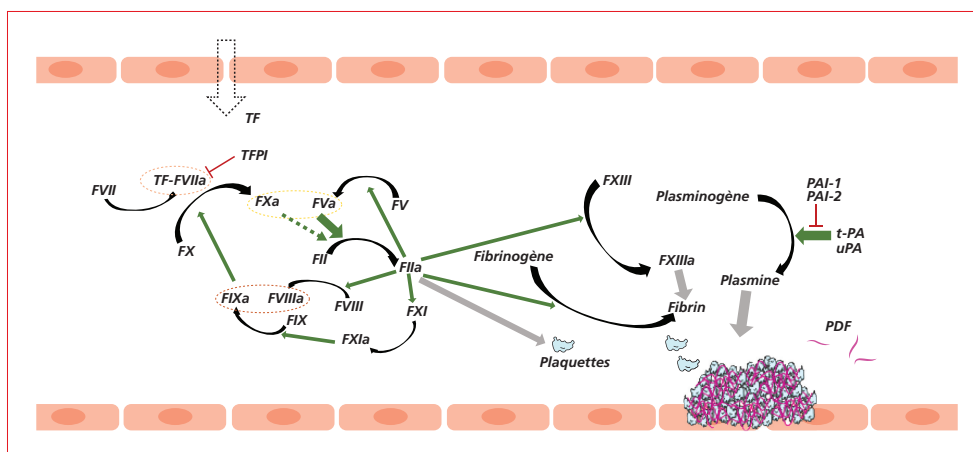


Figure 1 • Schéma simplifié de la cascade de la coagulation. En présence d'une lésion vasculaire, le facteur tissulaire (TF) est libéré et entraîne l'activation du facteur VII (FVIIa) et du facteur X (FXa). Le FXa convertit la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa) et cette thrombine va amplifier sa propre formation par l'activation du facteur V (FVa), du facteur VIII (FVIIIa) et du facteur XI (FXIa). Le FXIa peut activer le facteur IX (FIXa) et va activer le FX avec l'aide du FVIIIa. La thrombine va cliver le fibrinogène et entraîner la formation de fibrine insoluble. Le caillot de fibrine est ensuite stabilisé par le facteur XIII activé (FXIIIa). La lyse du caillot est ensuite possible avec l'aide de la conversion du plasminogène en plasmine via l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'activateur plasminogène urokinase (uPA) conduisant à la formation de produits de dégradations de la fibrine (PDF).

migration des cellules immunitaires dans le côlon conjointement à une diminution des marqueurs inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF- α . En ce qui concerne le facteur VII (FVII), celui-ci contribue quand il est activé à l'initiation de la coagulation en se liant au FT. Mais là encore, les données sont contradictoires. Certaines études ont observé une augmentation et d'autres une diminution de son activation dans les MICI [16]. Il a été montré que le facteur X (FX) qui fait partie de la phase finale de la coagulation (figure 1), a des concentrations augmentées dans la RCH aigue. Le facteur X activé (FXa) n'est pas associé à l'activité de la maladie en dépit du fait que les marqueurs *in vivo* de la coagulation soient augmentés avec l'activité de la maladie. Cela ne veut pas dire que les anti-Xa ne soient pas efficaces comme anticoagulant dans ces maladies [17]. Le facteur V (FV), qui est activé par la thrombine (figure 1), est augmenté à la fois dans la RCH et dans la MC [12]. Le FVIII, qui est une protéine essentielle à la coagulation, a en revanche été trouvé augmenté dans la plupart des publications. L'implication du FVIII dans les thromboses veineuses étant bien établie, ce facteur pourrait également jouer un rôle dans les thromboses chez les patients atteints de MICI [18].

Les variations en facteur XII (FXII) plasmatique diffèrent en fonction des études. Le facteur XI (FXI) est l'un des facteurs de la coagulation les plus augmentés dans les MICI, quelle que soit l'activité de la maladie [12] (figure 1).

L'absence du facteur IX (FIX) chez la souris, de la même manière que son inhibition, est capable de diminuer les symptômes d'une colite induite au DSS en limitant l'infiltration tissulaire des neutrophiles [19]. L'épithélium intestinal capable de synthétiser localement le FIX pourrait avoir des effets cellulaires par l'intermédiaire des récepteurs PAR. Il est intéressant de noter en revanche que les souris déficientes en FXII ne sont pas protégées des effets de la colite induite par le DSS [20].

Aucune donnée définitive n'a été publiée sur la plupart des facteurs de coagulation et la majorité des conclusions ont été basées sur un nombre limité de patients. Les résultats des modèles animaux bien qu'intéressants ne permettent pas non plus de préciser la séquence cellulaire et moléculaire des effets pro-thrombotiques. Des études à grande échelle avec un plus grand nombre de patients et une mesure systématique des facteurs de coagulation en fonction de l'activité de la maladie sont nécessaires pour conclure sur l'effet causal possible de ces facteurs de coagulation dans l'augmentation du risque thrombotique associé aux MICI. Ceci explique que les indications des traitements anti-coagulants quelles que soient les molécules choisies ne peuvent pas encore faire l'objet d'un consensus [5].

/// Les résultats des modèles animaux bien qu'intéressants ne permettent pas non plus de préciser la séquence cellulaire et moléculaire des effets pro-thrombotiques ///

Formation du caillot de fibrine et altération de la fibrinolyse

De la même manière que pour la majorité des autres facteurs de la coagulation, les concentrations circulantes mesurées en fibrinogène diffèrent en fonction des études. Certaines ont montré une augmentation dans la MC et dans la RCH [21] et d'autres uniquement dans la MC ou seulement dans la RCH. Une explication possible provient du fait que le fibrinogène est bien connu comme étant corrélé à l'état inflammatoire, état qui varie fortement au cours de la maladie dans les MICI.

Une diminution du facteur XIII (FXIII) corrélée à l'activité de la maladie a été montrée chez les patients atteints de MICI [22]. Cette diminution pourrait provenir d'une consommation du FXIII dans des microthrombi disséminés dans la microcirculation et les capillaires intestinaux.

Pour les marqueurs de dégradation de la fibrine (D-dimères), les tests cliniques du temps de coagulation (APTT : temps de céphaline avec activateur, PT : temps de prothrombine) montrent des variations importantes en fonction des études, qui vont de l'absence de modification à un prolongement des temps de coagulation [12, 16, 21]. Mais, un temps de coagulation abaissé dans les MICI n'a encore été démontré dans aucune étude.

Côté fibrinolyse, quelques études indiquent une altération chez ces patients. Les concentrations circulantes en plasminogène sont inchangées chez les patients atteints de MICI. Les variations de concentrations de l'activateur tissulaire de la plasmine (tPA) sont importantes. Plusieurs études ont décrit une augmentation [21,22], d'autres une diminution à la fois pour l'antigène et son activité enzymatique [23], alors que d'autres études n'ont pas montré de différences [24].

De manière similaire les concentrations en inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) sont très variables. Cependant la majorité des études a montré une augmentation [21, 22, 24]. Le travail de Kaiko *et al.* a observé que l'expression du PAI-1 était élevée chez les patients atteints de MICI ne répondant pas aux anti-TNF- α [25]. Le PAI-1 dont le rôle est de bloquer l'activateur tissulaire de la plasmine (tPA), amplifie les altérations de la muqueuse intestinale tandis que son inhibition les réduit. De plus, l'urokinase (un des activateurs du plasminogène) intervient dans la migration cellulaire (CE ou encore cellules musculaires lisses vasculaires) par l'intermédiaire de son récepteur [26]. Ainsi, l'inhibition de PAI-1 diminue la migration des cellules musculaires lisses vasculaires et la formation de la neointima [27]. Ces effets cellulaires pourraient avoir une importance dans les atteintes vasculaires locales intestinales des MICI. Une étude publiée en 2019 a montré que le PAI-1 pouvait se lier au FXI activé (FXIa) à la surface des CE aboutissant à sa clairance et dégradation [28]. Ce nouveau mécanisme met en lumière les interactions complexes entre la coagulation, la fibrinolyse, les fonctions endothéliales et des cellules musculaires qui participent sûrement à la

pathogénèse des thromboses dans les MICI. L'augmentation du PAI-1 suggère une diminution de la fibrinolyse tout comme la diminution de l'inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine (TAFI) [29].

Concernant des tests plus intégratifs, le temps de lyse du caillot est prolongé chez les patients atteints de MICI [30].

/// Le temps de lyse du caillot est prolongé chez les patients atteints de MICI ///

Le fibrinogène est augmenté dans les MICI en phase active et la formation de caillots est affectée avec une consommation élevée de FXIII alors que les temps de coagulation ne sont pas significativement altérés. La fibrinolyse est diminuée en partie via l'élévation de PAI-1. L'équilibre entre l'activation de la coagulation et la fibrinolyse est dérégulé et tend vers un phénotype prothrombotique.

/// L'équilibre entre l'activation de la coagulation et la fibrinolyse est dérégulé et tend vers un phénotype prothrombotique ///

Conclusion

Jusqu'à présent, les changements de réactivité du système de la coagulation qui ont été clairement décrits pour la MC et la RCH actives comprennent une augmentation des TAT, des F1+2 et des D-dimères pour les marqueurs *in vivo* de la coagulation et de la fibrinolyse et une augmentation plasmatique des facteurs FV, FVIII, VWF, fibrinogène et PAI-1. Ces changements sont résumés sur la *figure 2*. Cependant, les temps de coagulation sont inchangés ou même retardés malgré une augmentation importante de la concentration de fibrinogène. Les augmentations substantielles en termes de réactivité plaquettaire et la nette augmentation du nombre de plaquettes chez les patients atteints de MICI plaident fortement en faveur d'un rôle crucial des plaquettes dans l'augmentation du risque thrombotique. La fibrinolyse a également été identifiée comme étant fortement altérée dans les MICI. En outre, il est clair que des données contradictoires ont été décrites dans la littérature la plus récente. Certaines de ces divergences pourraient provenir de l'utilisation de protocoles différents en particulier dans la préparation des échantillons de sang et de plasma.

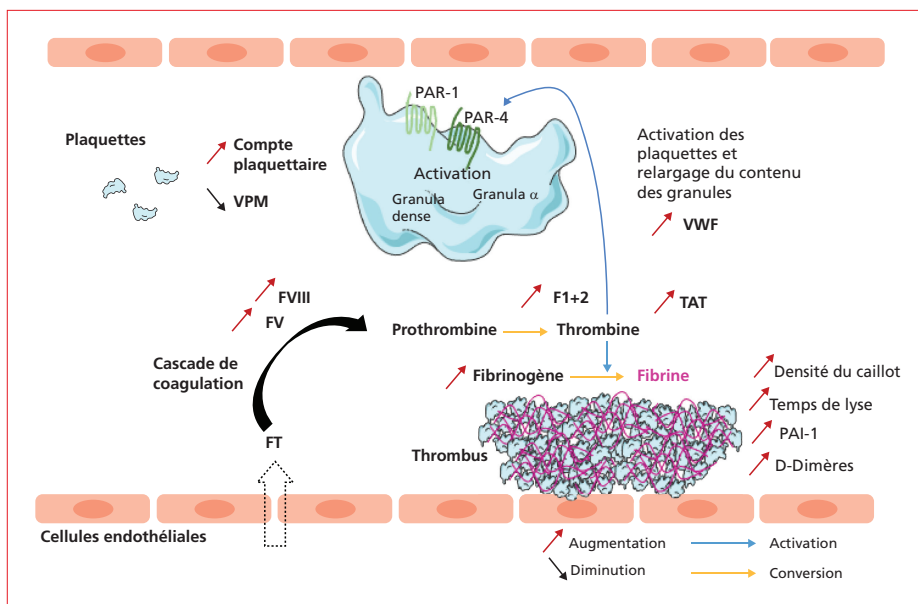


Figure 2 • Changements hémostatiques associés au risque de thrombose chez les patients atteints de MICI. La numération plaquettaire est augmentée et le volume plaquettaire moyen (VPM) est diminué. L'augmentation de la réactivité des plaquettes aboutit au relargage du contenu des granules avec une augmentation du facteur von Willebrand (VWF). La libération du facteur tissulaire (FT) après une lésion entraîne l'activation de la cascade de coagulation et aboutit à la conversion de prothrombine en thrombine et du fibrinogène en fibrine. Chez ces patients, les concentrations en fibrinogène sont augmentées. Le caillot va être plus dense et le temps de lyse rallongé. Les produits de dégradation de la fibrine comme les D-dimères sont augmentés. (TAT : complexe thrombine-antithrombine ; F1+2 : fragment 1+2 de la prothrombine en thrombine).

Enfin, les barrières épithéliale et/ou endothéliale sont altérées se traduisant par une diminution de l'expression de protéines anticoagulantes. À ce jour, seule, une étude a été réalisée sur l'effet des traitements classiques et plus récents des MICI dans les phases actives et inactives et sur le risque thrombotique [14]. Une méta-analyse récente sur le risque de MTEV dans les MICI après la prise de stéroïdes ou d'anti-TNF- α a montré un risque plus élevé après un traitement aux stéroïdes mais une protection avec les anti-TNF- α [31].

Compte tenu des variabilités dans les résultats publiés jusqu'à présent, de nouvelles études tant au niveau fondamental que clinique dans de larges populations (classifiées sur des facteurs de gravité) sont nécessaires pour comprendre les mécanismes prothrombotiques chez ces patients. Elles permettraient l'identification d'un profil biologique prothrombotique et l'identification de sous-groupes présentant un risque plus élevé de thrombose et pour lesquels un traitement antithrombotique personnalisé pourrait être envisagé tenant compte également des risques hémorragiques dus à ces traitements. Le développement de nouvelles approches thérapeutiques (pharmacologiques, anticorps monoclonaux, nanobodies, peptides, immunothérapies) ayant potentiellement une fonction antithrombotique ciblée et également anti-inflammatoire, pourrait être une véritable avancée pour traiter à la fois la maladie dans toutes ses composantes et limiter le risque de thrombose.

TAKE HOME MESSAGES

- Les patients atteints de MICI ont une nette augmentation de la numération plaquettaire et une diminution du volume plaquettaire moyen avec une réactivité plus élevée qui pourrait participer à l'augmentation du risque thrombotique.
- Les résultats des modèles animaux bien qu'intéressants ne permettent pas non plus de préciser la séquence cellulaire et moléculaire des effets prothrombotiques.
- Les indications des traitements anticoagulants quelles que soient les molécules choisies ne peuvent pas encore faire l'objet d'un consensus.
- Le fibrinogène est augmenté dans les MICI en phase active et la formation de caillots est affectée avec une consommation élevée de facteur XIII alors que les temps de coagulation ne sont pas significativement altérés.
- Le développement de nouvelles approches thérapeutiques ayant potentiellement une fonction antithrombotique ciblée et également anti-inflammatoire, pourrait être une véritable avancée pour traiter à la fois la maladie dans toutes ses composantes et limiter le risque de thrombose.

Ces données ont fait récemment l'objet d'un consensus au plan clinique sur la prévention des accidents thrombotiques chez ces patients, publié dans *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* en 2021.

Liens d'intérêts :

les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

Références

Les références importantes apparaissent en gras.

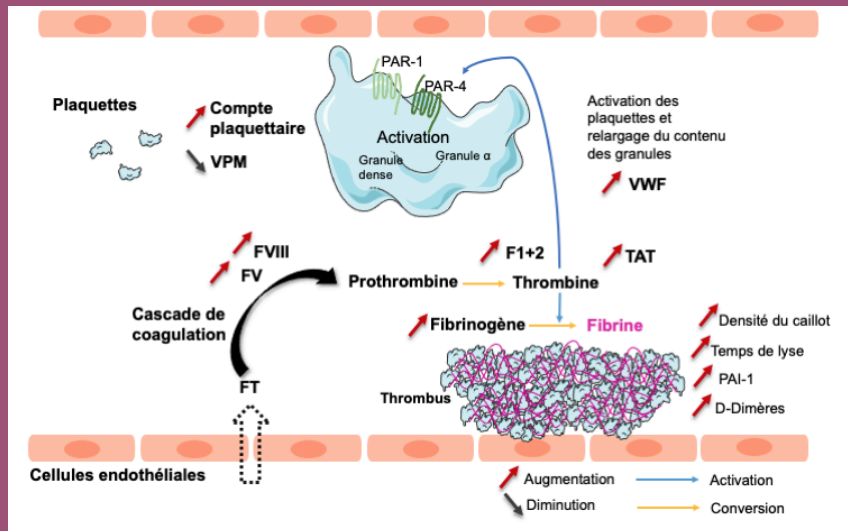
- 1 • Fumery M, Xiaocang C, Dauchet L, et al. Thromboembolic events and cardiovascular mortality in inflammatory bowel diseases: A meta-analysis of observational studies. *J Crohns Colitis* 2014 ; 8 (6) : 469-79.
- 2 • Novacek G, Weltermann A, Sobala A, et al. Inflammatory Bowel Disease Is a Risk Factor for Recurrent Venous Thromboembolism. *Gastroenterology* 2010 ; 139(3) : 779-787.e1.
- 3 • Kirchgessner J, Beaugerie L, Carrat F, et al. Increased risk of acute arterial events in young patients and severely active IBD: a nationwide French cohort study. *Gut* 2018 ; 67(7) : 1261-8.
- 4 • Morowitz DA. Thrombocytosis in Chronic Inflammatory Bowel Disease. *Ann Intern Med* 1968 ; 68(5) : 1013.
- 5 • Lagrange J, Lacolley P, Wahl D, et al. Shedding Light on Hemostasis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2021 ; 19 (6) : 1088-1097.e6.
- 6 • Collins CE, Cahill MR, Newland AC, et al. Platelets circulate in an activated state in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994 ; 106(4) : 840-5.
- 7 • Ye L, Zhang YP, Yu N, et al. Serum platelet factor 4 is a reliable activity parameter in adult patients with inflammatory bowel disease: A pilot study. *Medicine* 2017 ; 96(11) : e6323.
- 8 • Schmid W, Vogelsang H, Papay P, et al. Increased responsiveness to thrombin through protease-activated receptors (PAR)-1 and -4 in active Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2014 ; 8(6) : 495-503.
- 9 • Cibor D, Owczarek D, Butenas S, et al. Levels and activities of von Willebrand factor and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif, number 13 in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2017 ; 23(26) : 4796.
- 10 • Yan SLS, Russell J, Harris NR, et al. Platelet Abnormalities during Colonic Inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2013 ; 19(6) : 1245-53.
- 11 • Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007 ; 21(2) : 99-111.
- 12 • Kume K, Yamasaki M, Tashiro M, et al. Activations of Coagulation and Fibrinolysis Secondary to Bowel Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis. *Intern Med* 2007 ; 46 (17) : 1323-30.
- 13 • Saibeni S, Saladino V, Chantarangkul V, et al. Increased thrombin generation in inflammatory bowel diseases. *Thrombosis Res* 2010 ; 125(3) : 278-82.
- 14 • Tripodi A, Spina L, Pisani LF, et al. Anti-TNF- α Treatment Reduces the Baseline Procoagulant Imbalance of Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2021 ; 27 (12) : 1901-8.
- 15 • Queiroz KCS, van't Veer C, van den Berg Y, et al. Tissue Factor-Dependent Chemokine Production Aggravates Experimental Colitis. *Molecular Med* 2011 ; 17(9-10) : 1119-26.
- 16 • Yazici A. Thrombophilic Risk Factors in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Res* 2010 ; 3(3) : 112-9.
- 17 • Undas A, Owczarek D, Gissel M, et al. Activated factor XI and tissue factor in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010 ; 16(9) : 1447-8.
- 18 • Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR, et al. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995 ; 345(8943) : 152-5.
- 19 • Khandagale A, Kittner JM, Mann A, et al. Coagulation factor 9-deficient mice are protected against dextran sulfate sodium-induced colitis. *Biol Open* 2018 ; 7(7) : bio034140.
- 20 • Wang B, Yang A, Zhao Z, et al. The Plasma Kallikrein-Kinogen Pathway Is Critical in the Pathogenesis of Colitis in Mice. *Front Immunol* 2018 ; 9 : 21.

- 21** • Alkim H, Ayaz S, Alkim C, *et al.* Continuous active state of coagulation system in patients with nonthrombotic inflammatory bowel disease. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011 ; 17 (6) : 600-4.
- 22** • Hayat M, Ariëns RAS, Moayyedi P, *et al.* Coagulation factor XIII and markers of thrombin generation and fibrinolysis in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002 ; 14(3) : 249-56.
- 23** • de Jong E, Porte RJ, Knot EA, *et al.* Disturbed fibrinolysis in patients with inflammatory bowel disease. A study in blood plasma, colon mucosa, and faeces. *Gut* 1989 ; 30(2) : 188-94.
- 24** • Weber P, Husemann S, Vielhaber H, *et al.* Coagulation and Fibrinolysis in Children, Adolescents, and Young Adults with Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999 ; 28(4) : 418-22.
- 25** • Kaiko GE, Chen F, Lai CW, *et al.* PAI-1 augments mucosal damage in colitis. *Sci Transl Med* 2019 ; 11 (482) : eaat0852.
- 26** • Czekay RP, Wilkins-Port CE, Higgins SP, *et al.* PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *Int J Cell Biol* 2011 ; 2011 : 562481.
- 27** • Ji Y, Weng Z, Fish P, *et al.* Pharmacological Targeting of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Decreases Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointima Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016 ; 36(11) : 2167-75.
- 28** • Puy C, Ngo ATP, Pang J, *et al.* Endothelial PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) Blocks the Intrinsic Pathway of Coagulation, Inducing the Clearance and Degradation of FXIa (Activated Factor XI). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019 ; 39(7) : 1390-401.
- 29** • Koutroubakis IE, Ramos-Rivers C, Regueiro M, *et al.* The influence of anti-TNF agents on hemoglobin levels of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2015 ; 21(7) : 1587-93.
- 30** • Bollen L, Vande Casteele N, Peeters M, *et al.* The Occurrence of Thrombosis in Inflammatory Bowel Disease Is Reflected in the Clot Lysis Profile. *Inflamm Bowel Dis* 2015 ; 21 (11) : 2540-8.
- 31** • Sarlos P, Szemes K, Hegyi P, *et al.* Steroid but not Biological Therapy Elevates the risk of Venous Thromboembolic Events in Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *J Crohns Colitis* 2018 ; 12(4) : 489-98.

Ce qu'il faut retenir :

MICI et thrombose

Maladie de Crohn atteint la totalité du tube digestif
Rectocolite hémorragique atteint le colon et le rectum
Maladie multifactorielle
Risque de thrombose augmenté
Dérégulation de l'hémostase et de la coagulation
Numération plaquettaire augmentée
Fibrinogène augmenté
Augmentation du facteur VWF
Phénotype biologique prothrombotique



6. Modèles animaux de MICI

De nombreux modèles animaux ont été choisis pour étudier les MICI ⁷⁸. Des modèles knock-out (KO) ont été développés pour l'IL-2 ⁷⁹ ou encore l'IL-10 ⁸⁰. Des entérocolites apparaissent spontanément chez ces souris. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire clé dans la MC et la RCH ^{81,82}. Les souris IL-10 KO développent une colite après l'âge de 3 mois ⁸⁰. Le microbiote joue un rôle majeur dans la colite. Les patients MICI ont une dysbiose intestinale ⁵⁸. Grâce aux souris IL-10 KO, il est possible d'étudier les probiotiques. Le développement de la colite chez ces souris est stoppé lorsqu'elles sont maintenues dans des conditions stériles ⁸³.

L'IL-2 est un facteur de croissance pour les lymphocytes T et est nécessaire pour l'homéostasie des lymphocytes T en supprimant une réponse excessive. Les souris IL-2 KO développent des maladies auto-immunes systémiques caractérisées par une colite, une gastrite, une hépatite, une pneumonie, une pancréatite, et une anémie hémolytique ⁷⁹. Le taux de survie de ces souris est faible, la plupart meurent entre 4 et 9 semaines après la naissance. Celles qui survivent développent à partir de 6 semaines d'âge jusqu'à 3 mois une colite avec infiltration de lymphocytes T au niveau de la muqueuse colique ⁷⁹.

La colite peut également être induite grâce à des agents chimiques. Le Sulfate de Dextran Sodique (DSS) est couramment utilisé pour induire une colite chez la souris. Le DSS induit une colite mimant la RCH ⁸⁴. Le DSS est un polysaccharide soluble dans l'eau avec un poids moléculaire de 40-50 kDa. Le mécanisme exact du DSS n'est pas bien défini. Il engendre des lésions épithéliales du gros intestin permettant alors la dispersion du contenu intestinal (bactéries) dans les tissus sous-jacents. Le modèle de colite au DSS est très connu et utilisé en raison de sa facilité d'utilisation et de sa rapidité d'action. Avec le DSS, il est possible de reproduire les phases aiguës ou chroniques d'inflammation intestinale en ajustant la concentration de DSS et la durée d'administration ^{85,86}. Un autre modèle très utilisé est l'acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique (TNBS). Il est administré par voie rectale à l'animal. Le TNBS mime la MC. C'est un modèle robuste et bien documenté pour étudier les mécanismes immunologiques qui jouent un rôle dans la pathologie des MICI ^{87,88}.

Il existe une multitude de modèles pour induire une colite chez la souris : Knock out total, conditionnel, surexpression de gène ou agent chimique (*tableau 2*).

Type de mutation	Caractéristiques	Référence
IL-10 Knock Out	Développe colite à l'âge de 3 mois. Balb/c + sensible que C57BL/6	Kühn <i>et al.</i> 1993
IL-2 Knock Out	Développe maladie auto-immune avec colite. Viabilité faible	Sadlack <i>et al.</i> 1993
STAT3 Knock Out conditionnel	Développe colite à l'âge de 20 semaines	Takeda <i>et al.</i> 2006
TGF β 1 Knock Out conditionnel	Knock Out total faible Espérance de vie > 4 semaines. Développe inflammation multi organes : colon, foie, estomac, duodénum.	Shull <i>et al.</i> 1992 Gorelik and Flavell. 2000
IL-7 surexpression	Cytokine nécessaire au développement lymphocytes T. Développe une colite entre 4 et 12 semaines d'âge.	Watanabe <i>et al.</i> 1998
Intégrine α v Knock Out cellules endothéliales	Intégrine participant à la survie cellulaire et l'adhésion cellulaire. Inflammation multi organe à partir de 14 semaines : colon, cæcum, foie.	Lacy-Hulbert, Adam <i>et al.</i> 2007
DSS	Agent chimique induisant une colite (RCH). Érosion, ulcère, destruction des cryptes coliques.	Chassaing <i>et al.</i> 2014
TNBS	Agent chimique induisant une colite (MC). Colite transmurale. Infiltration lymphocyte T, neutrophiles et macrophages.	Scheiffele, Frank, and Ivan J Fuss. 2002
Oxazolone	Agent chimique induisant une colite (RCH). Microulcération épithéliale, inflammation muqueuse.	Kojima <i>et al.</i> 2004

Tableau 2 : Exemples de modèles disponibles pour étudier les MICI chez la souris

STAT3 : « Signal transducer and activator of transcription 3 » (facteur de transcription), *TGF* : « transforming growth factor » (facteur de croissance)

PARTIE 2 : HYPOTHESES & OBJECTIFS

Dans la littérature, une méta-analyse a montré une augmentation du risque de thrombose chez les patients MICI démontrant l'importance d'en comprendre les mécanismes ⁶⁵. Une étude préliminaire effectuée au laboratoire a montré une augmentation de la génération de thrombine accompagnée d'une augmentation des concentrations circulantes de facteur VWF chez les patients atteints de MICI (résultats non publiés). Le facteur VWF a la capacité de lier et d'activer les plaquettes ⁸⁹. La numération plaquettaire est également augmentée chez ces patients. En revanche comment l'interaction entre le facteur VWF et les plaquettes participe au phénotype procoagulant chez les patients atteints de MICI n'a pas été étudié.

L'activation accrue de la coagulation provoquée par l'inflammation chronique présente chez les patients atteints de MICI et implique à la fois les cellules immunitaires, des cellules de la paroi vasculaire et des molécules circulantes et joue un rôle central dans la survenue de thromboses chez ces patients. Nous formulons l'hypothèse que les plaquettes et le facteur VWF et en particulier leurs interactions jouent un rôle central dans le phénotype procoagulant lié aux MICI.

Une seconde hypothèse est que cette activation accrue de la coagulation *via* les plaquettes et le facteur VWF reflète les dommages endothéliaux liés à une réponse de type immunothrombose, cette dernière conduisant à immunoinflammation systémique et locale au niveau du colon ⁹⁰. Il s'agit dans un 2^{ème} temps de déterminer si l'activation de la cascade de coagulation est secondaire à une inflammation chronique et/ou représente une caractéristique primaire acquise ou non et indépendante de l'activité clinique de la maladie.

L'objectif de notre travail de thèse a été de rechercher les mécanismes moléculaires causant la mise en place d'un phénotype biologique prothrombotique au cours des MICI. Mes études se sont appuyées sur une démarche translationnelle avec un modèle humains grâce à une cohorte prospective de patients atteints de cette affection et suivis au CHRU de Nancy (cohorte I-BANK). Ainsi qu'un modèle expérimentale classique de MICI chez la souris.

Les objectifs ont été les suivants :

- Caractérisation du phénotype biologique de coagulation sur la cohorte du CHRU :
 - Identifier des sous-populations de patients définis en fonction du type de traitements suivis, des paramètres de la coagulation et des paramètres cliniques (score de la maladie).
- Caractérisation du phénotype biologique de coagulation dans un modèle expérimental de colite aiguë chez la souris invalidée pour VWF

Contrôle	Contrôle avec colite	VWF KO contrôle	VWF KO avec colite
----------	----------------------	-----------------	--------------------

- Analyser la contribution des plaquettes et du VWF dans la colite à travers des mesures de la génération de thrombine, des paramètres de la sévérité de la colite et des dosages des molécules de la coagulation.

Les résultats pourront aider à la validation de biomarqueurs caractérisant les causes ou conséquences de la maladie pour à plus long terme, la mise en place d'une médecine personnalisée pour identifier les patients à risque de thrombose, prévenir leurs survenues ou les traiter au cours du développement de la maladie.

PARTIE 3 :
MATERIELS &
METHODES

1. Étude clinique : Identification de biomarqueurs pronostiques de l'histoire naturelle et prédictifs de la réponse aux biothérapies au cours des maladies inflammatoires chroniques intestinales (I-BANK)

1.1 Spécimens biologiques

I-BANK est une étude prospective et monocentrique. La première inclusion a eu lieu en décembre 2019. Elle permet d'inclure des patients atteints de MC et des patients atteints de RCH. Elle va permettre la collecte d'échantillons biologiques (sang, salive, urine et selle) pour constituer une « MICIthèque » et pouvoir détecter et valider des signatures génomiques et épigénomiques prédictives de la réponse aux biothérapies. La cohorte I-BANK (NCT03809728) a reçu l'accord du comité de protection des personnes (CPP) NORD OUESTS II 2019-13, N°ID RCB : 2018-A00037-50 et chaque patient a signé un consentement éclairé. Cette étude est réalisée en collaboration avec le service de gastroentérologie du CHRU de Nancy et l'équipe 2 de l'unité UMR_S (unité mixte de recherche) 1256 (dirigé par le Pr. Laurent Peyrin-Biroulet). Lors de chaque inclusion, plusieurs tubes sont prélevés. Il s'agit de 5 tubes EDTA (éthylène diamine tétra acétique) de 6 mL, 2 tubes héparines de 4 mL et 2 tubes CTAD (Citrate, Théophylline, Adénosine, Dipyridamole) de 4,5 mL, soit un volume total de 47 mL. Les échantillons sont ensuite envoyés au Centre de Ressources Biologies Lorrain (CRB) du CHRU de Nancy. Cette biobanque contient du sérum, du plasma citraté, du plasma EDTA, des cellules mononucléées sanguines isolées par Ficoll.

Lors de la réception des échantillons à l'unité UMR_S 1116, la numération sanguine est effectuée grâce à l'appareil HORIBA ABX Micros 60 (2 tubes CTAD et 2,5 mL de sang EDTA).

Le plasma riche en plaquettes (PRP) est préparé à partir du sang total, une première centrifugation est faite à 190 g pendant 10 minutes à 20°C. Après cette centrifugation, du plasma riche en plaquettes est obtenu et prélevé, puis une numération est réalisée pour déterminer la concentration plaquettaire. Une 2^{ème} centrifugation est faite à 1750 g pendant 10 minutes à 20°C pour obtenir du plasma pauvre en plaquettes (PPP) et ainsi diluer le PRP pour l'ajuster à une concentration de 200 G/L.

Pour obtenir le PPP, une 3^{ème} centrifugation est faite à 13000 g pendant 30 minutes à 4°C. Après cela, le PPP est congelé à -80°C.

1.2 Thrombinographie

La thrombinographie est un procédé utilisé pour suivre la cinétique de génération et d'inhibition de la thrombine formée dans un PRP ou PPP grâce à un substrat fluorigène spécifique ajouté à la réaction. Plusieurs paramètres peuvent être mesurés lors de cette cinétique : le temps de latence qui correspond à la durée de la phase d'initiation (minutes), la quantité maximale de thrombine formée qui correspond au pic de la courbe (nM) et le temps pour atteindre ce pic (minutes). D'autres paramètres sont obtenus tels que le potentiel de thrombine (ETP = potentiel endogène de thrombine) qui est calculé grâce à l'aire sous la courbe et correspondant à la quantité totale de thrombine formée au cours du temps. Enfin, la vélocité qui correspond à l'index de propagation (nM/minutes) de la formation de thrombine.

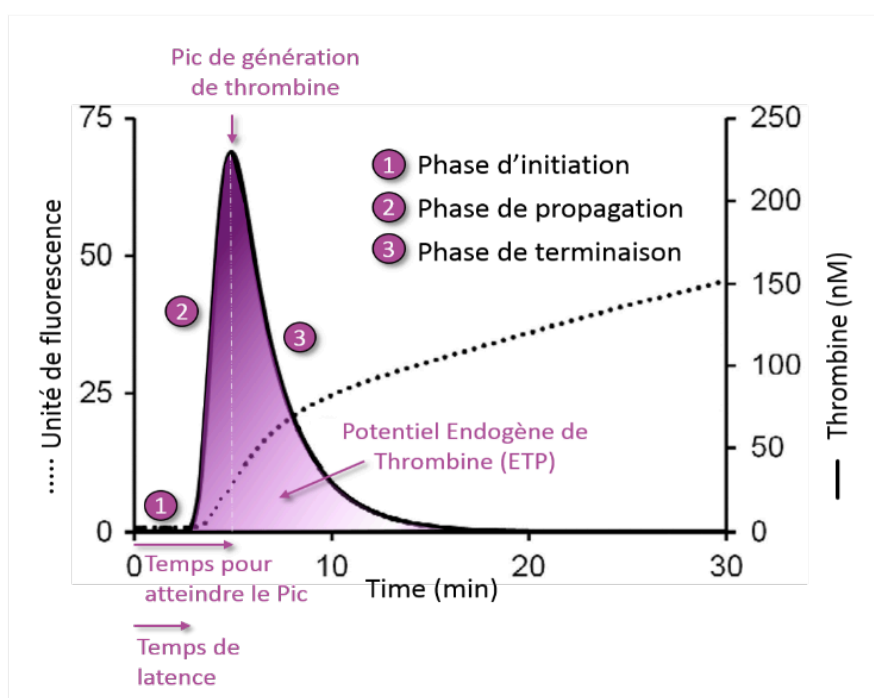


Figure 10 : Schéma des paramètres mesurés et calculés lors de l'analyse de la génération de thrombine

La génération de thrombine comporte 3 phases : initiation, propagation et terminaison. Grâce au suivi de la cinétique, plusieurs paramètres sont obtenus : le temps de latence qui correspond au début de la courbe, le pic de génération de thrombine qui est la quantité maximale de thrombine formée, le temps pour atteindre le pic et le potentiel endogène de thrombine qui correspond à l'aire sous la courbe.

L'appareil de mesure utilisé est le fluorimètre Fluoroskan Ascent (Labsystems) avec le logiciel dédié Thrombinoscope® version 3.1.0.55 (Synapse B.V) avec le substrat fluorigène de la thrombine Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem). La lecture de la fluorescence se fait avec une longueur d'onde d'excitation à 390 nm et une longueur d'onde d'émission à 460 nm.

Un calibrant est ajouté en duplicata sur la plaque (mélange d'un complexe α 2-macroglobuline/thrombine humaine à une activité de 570 nM avec de l'antithrombine à 100 nM et de l'héparine à 2 U/mL) (Synapse B.V). Ce dernier va servir à corriger les effets de la consommation du substrat et l'influence de facteurs optiques intrinsèques du plasma, de l'appareillage et des consommables. Les mesures sont réalisées en duplicata dans des microplaques 96 puits en polypropylène à fond rond (Greiner).

1.2.1 La génération de thrombine sur du plasma riche en plaquettes

La génération de thrombine est effectuée avec du PRP (partie 1.1).

Dans deux puits, 10 μ L de calibrant + 40 μ L de plasma sont ajoutés et dans les autres puits 2,5 μ L de facteur tissulaire à une concentration finale de 0,5 pM, 7,5 μ L de tampon HBS (Hépès 20 mM, NaCl 140 mM et contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 5 g/L et pH 7,5) et 40 μ L de plasma. La plaque est placée dans le fluorimètre pendant 10 minutes à 37°C avant l'ajout par la machine de 10 μ L d'un mélange de substrat Z-Gly-Arg-AMC à 2,5 mM en Hépès 20 mM, pH 7,35, contenant de la BSA à 60 g/L, du CaCl₂ 100 mM et de l'eau.

1.2.2 La génération de thrombine sur plasma pauvre en plaquette

Comme précédemment, deux puits de 10 μ L de calibrant + 40 μ L de PPP puis dans les autres puits 2,5 μ L de facteur tissulaire, 2,5 μ L de vésicules phospholipidiques (VP) constitué de phosphatidyl-choline/phosphatidyl-sérine/phosphatidyl-éthanolamine (PC/PS/PE) dans un rapport 60/20/20 moles % à une concentration finale de 4 μ M, 5 μ L d'HBS et 40 μ L de PPP.

La plaque est placée dans le fluorimètre pendant 10 minutes à 37°C avant l'ajout par la machine de 10 μ L d'un mélange de substrat Z-Gly-Arg-AMC à 2,5 mM en Hépès 20 mM, pH 7,35, contenant de la BSA à 60g/L, du CaCl₂ 100 mM et de l'eau.

1.3 Frottis sanguin

Des lames Polysine (ThermoFischer®) sont utilisées pour réaliser les frottis sanguins en sang total (*figure 11*). 5 µL de sang est étalé sur la lame. Les lames sont fixées dans un bain de méthanol durant 5 minutes.

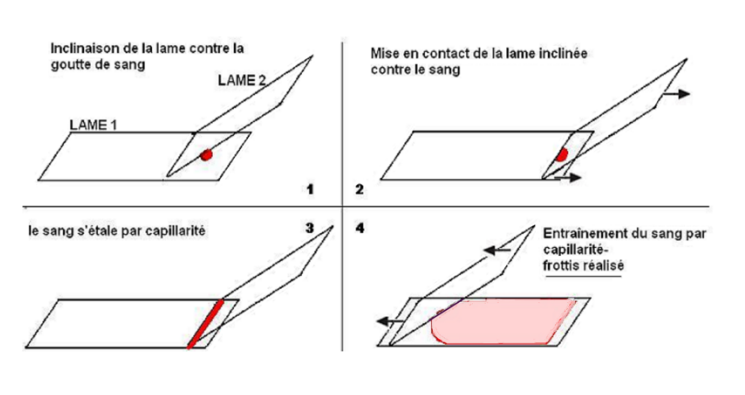


Figure 11 : Technique étalement frottis sanguin (SVT académie de Versailles)

1.4 Immunohistochimie

Les frottis sanguins ont été colorés avec une coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) au sein du laboratoire d'hématologie biologique du CHRU de Nancy (*figure 12*). Pour chaque frottis, les amas plaquettaires ont été comptés dans 5 champs indépendants sous un microscope Nikon Eclipse Ti2 en utilisant l'objectif x40. Les amas ont été divisés en 2 groupes : 2 à 5 plaquettes par amas, et plus de 5 plaquettes par amas.

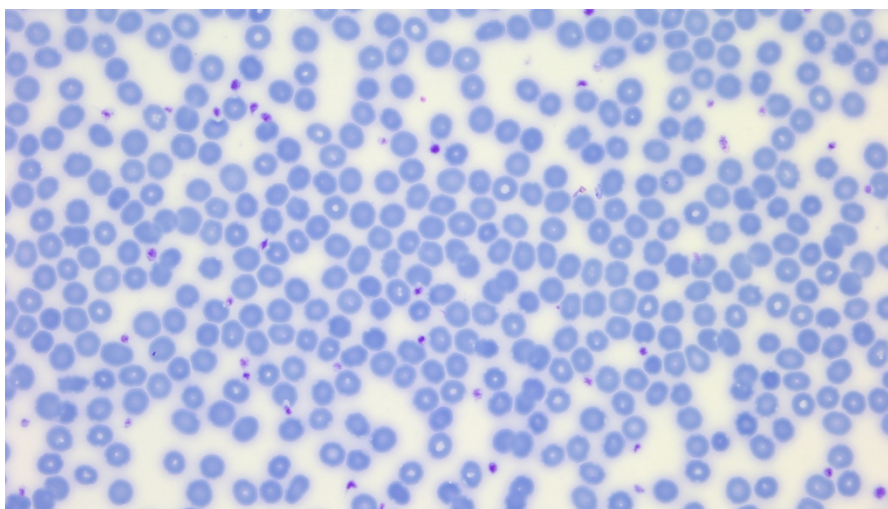


Figure 12 : Frottis sanguin après fixation au méthanol et coloration MGG

2. Expérimentation animale

2.1 Bien-être animal

Les animaux C57BL/6 mâles contrôles de 8 semaines proviennent de Charles River et ont été hébergés à l'animalerie INSERM (institut national de la santé et de la recherche médicale) du site de la faculté de médecine ayant le numéro d'agrément pour l'hébergement et l'utilisation B 54-547-22. Un protocole animal a été rédigé indiquant les procédures et le nombre d'animaux nécessaire. Le modèle animal a été choisi en fonction de la littérature actuelle. Les conditions d'hébergement des animaux sont encadrées et strictes. Ils disposent de cages avec enrichissement, eau et nourriture accessibles à volonté. Des points limites sont fixés pour éviter la souffrance des animaux : perte de poids >20%, yeux fermés, poil hérissé, déshydratation, automutilation.

Les souris VWF KO ont été hébergées et utilisées à l'animalerie de l'UMR_S 1176 ayant un numéro d'agrément, d'hébergement et d'utilisation E 94-043-013.

Les 2 projets initiés ont reçu l'accord du comité d'éthique lorrain et le MESRI (ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche) (APAFIS #2499) et parisien (APAFIS #29959).

2.2 Induction de la colite expérimentale

Les animaux ont été traités pendant cinq jours par du DSS à 3 % dissous dans l'eau du robinet pour induire une colite. La solution de DSS a ensuite été remplacée par de l'eau du robinet pendant trois jours supplémentaires. Les souris ont été mises à mort le 8^{ème} jour sous anesthésie à l'isoflurane suivie d'une dislocation cervicale.

2.3 Souris VWF KO

Cette lignée de souris est disponible à l'unité UMR_S 1176 « Hémostase, inflammation et Thrombose » à l'hôpital du Kremlin-Bicêtre à Paris. Ces souris sont génétiquement modifiées pour ne pas exprimer le facteur VWF. Un vecteur cible a été créé⁹¹. Les cellules embryonnaires ont été injectées dans la cavité blastocœle de blastocytes de souris C57BL/6J et ont été implantées dans des femelles pseudo-gémellaires. Les mâles chimériques alors obtenus ont été accouplés à des femelles sauvages C57BL/6J pour produire une descendance hétérozygote.

2.4 Score inflammatoire

Les souris sont pesées quotidiennement durant 8 jours et évaluées pour les symptômes cliniques afin d'établir un score clinique ou DAI pour « *Disease Activity Index* ». Cet indice a été calculé à partir de trois critères : la perte de poids, la consistance des selles et la présence de sang dans les selles (*tableau 3*). Le DAI permet d'évaluer la sévérité de la colite ⁹² et a été établi en faisant la moyenne de tous les scores quotidiens pour chaque souris.

Score	Perte de poids (%)	Consistance des selles	Rectorragie
0	0	Normale	Non
1	1-5	Molle	Non
2	5-10	Molle	Sang dans les selles +
3	10-15	Diarrhée	Sang dans les selles ++
4	>15	Diarrhée	Saignement rectal

Tableau 3 : Scores permettant de calculer le DAI chez la souris d'après Murthy et al.1993

2.5 Prélèvement et préparation des échantillons biologiques

2.5.1 Prélèvement sanguin

Les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane (1,5 % dans 1 L/min d'oxygène). Le sang a été prélevé par ponction du ventricule droit du cœur après ouverture du diaphragme de la cage thoracique et mélangé à du citrate à 10 % (109 mM). Le PRP et le PPP ont été préparés comme décrit dans la partie 1.1.

2.5.2 Préparation des organes

Le tube digestif a été prélevé en plusieurs parties : l'intestin proximal, l'intestin distal et le colon. Un morceau de chaque partie a été congelé directement dans l'azote liquide, une partie a été fixée dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% (référence HT501640-19L Sigma) pour inclusion en paraffine.

2.6 Étude histologique du colon

Les échantillons coliques ont été inclus en paraffine et des coupes de 6 µm sont réalisées au microtome. Les lames sont colorées en hématoxyline, éosine et safran (HES) au laboratoire d'anatomie et cytologie du CHRU de Nancy par automate. L'HES colore les noyaux en violet, l'éosine les cytoplasmes en rose et le safran les fibres de collagène en jaune. Une lecture en aveugle est réalisée par un anatomopathologiste. Un score a ensuite été établi en s'appuyant sur plusieurs critères : infiltration des cellules immunitaires, abcès cryptiques, absence des mucines, intégrité de l'épithélium et irrégularités architecturales des cryptes. Chaque critère est évalué sur une échelle allant jusqu'à 4 ^{42,93} (tableau 4).

Caractéristiques	Score
Infiltrat inflammatoire chronique (quantité de lymphocytes et de plasmocytes)	0 Aucune augmentation 1 Légère 2 Augmentation modérée 3 Augmentation marquée
Neutrophiles dans l'épithélium	0 Aucun 1 < 50 % de la crypte impliquée 2 > 50 % de la crypte impliquée
Ulcération (lésion épithéliale visible et une régénération et/ou fibrine et neutrophiles et/ou granulation tissulaire)	0 Absent 1 Présent
Infiltration aiguë de cellules inflammatoires	0 Aucun 1 Léger 2 Modérée 3 sévère
Déplétion en mucine	0 Aucun 1 Léger 2 Modérée 3 sévère
Neutrophiles dans la lamina propria	0 Aucun 1 Léger 2 Modérée 3 sévère

Plasmacytose basale	0 Aucun 1 Léger 2 Modérée 3 sévère
Anomalies architecturales	0 Aucune 1 < 5 % de la crypte impliquée 2 < 50 % de la crypte impliquée 3 > 50 % de la crypte impliquée

Tableau 4 : Score histologique de Nancy avec ses huit critères et le score associé d'après Marchal et al. 2015

3. Mesure de l'activation de plaquettes de souris par immunofluorescence

Pour cette expérience, le sang citraté est mis en présence de GPRP (Gly-Pro-Arg-Pro) utilisé pour faciliter l'étude des réactions plaquettaires et mimant la région N-terminale de la chaîne α de la fibrine à 2,5 mM et du CaCl_2 à 2,5 mM. Le sang a été activé avec du collagène de type 1 à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (référence AG005K-SD SD Medical), du TRAP-6 (peptide 6 activateur du récepteur de la thrombine) à 50 μM (référence HB-5533-FG Hart Biologicals) ou la combinaison des deux pendant 10 minutes à 37°C. Le sang activé avec le collagène, le TRAP-6 ou la combinaison des deux sont ensuite déposés dans des lab-tek 8 puits (ThermoFischer®) pendant 1 heure. Ces lab-tek ont été préalablement *coatées* à la fibronectine (référence C-43060 PromoCell) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (1 heure avant à 37°C). Les puits sont lavés plusieurs fois pour ôter le maximum de globules rouges. Les plaquettes adhérentes sont fixées au PFA 4% pendant 10 minutes puis rincées pour enlever le PFA. Après fixation, un marquage à la phalloïdine-488 (référence ab176753 Abcam) est effectué. Les puits sont incubés avec du PBS (tampon phosphate salin NaCl 1.4 M, KCL 26.8 mM, NaHPO 92.3 mM et KH_2PO_4 17.6 mM) + BSA 5% pendant 30 minutes puis rincés. La phalloïdine diluée au 1 :1000 dans du PBS + BSA 1% est déposée dans les puits pendant 30 minutes puis rincée. Le montage entre lame et lamelle est réalisé avec du fluoromount (référence F4680 Sigma). Des images sont prises avec le microscope Nikon Eclipse Ci et le logiciel NIS-Element. La quantification est faite avec le logiciel ImageJ et les résultats sont exprimés en nombre de plaquettes par mm^2 .

4. Dosage de la lipocaline tissulaire

Le côlon a été lysé à l'aide du kit de lyse cellulaire (Bio Rad). La lipocaline-2 (LCN-2) a été déterminée dans le tissu lysé (dilution 1 :100) à l'aide d'un kit ELISA (Duoset Lcn-2 ELISA Kit, R&D System).

5. Dosage par test ELISA

5.1 Dosage du VWF : Ag chez les patients MICI et chez la souris

Le dosage du facteur VWF a été réalisé suivant les indications du fournisseur sur plasma citrate (kit ASSERACHROM® VWF : Ag référence 00942 Stago). Ce test ELISA est réalisé chez l'homme et chez la souris.

5.2 Dosage du VWF actif chez les patients MICI

Le dosage du facteur VWF actif est réalisé grâce à un test ELISA permettant la détection du facteur VWF dans une conformation se liant à GPIIb/IIIa dans le plasma. La première étape a été d'ajouter 100 µL d'anticorps dérivé du lama (AU/VWFa-11). Cet anticorps qui reconnaît spécifiquement la conformation de liaison à GPIIb/IIIa est mis à une concentration de 5 µg/mL (dilué dans du tampon coating Na₂CO₃.10 H₂O 14.7 mM, NaHCO₃ 34.5 mM et NaN₃ 3.1 mM) sur une plaque 96 puits immuno Maxisorp toute une nuit à 4°C.

Le lendemain, la plaque est lavée avec du PBS contenant 0,1% de tween-20. Puis 150 µL de tampon de blocage (PBS, 3% BSA et 0,1 tween-20) sont ajoutés dans chaque puits durant 30 minutes à 37°C. La plaque est lavée 3 fois avec du PBS + 0,1 % de tween-20. Un volume de 100 µL de plasma dilué à plusieurs concentrations (1 :40, 1 :80, 1 :160 et 1 :320) est déposé dans la plaque puis incubé durant 1 heure à 37°C. La plaque est lavée 3 fois avec du PBS + 0,1 % de tween-20. Un volume de 100 µL d'anticorps anti-VWF conjugué HRP à 1 µg/mL (référence GA52761-2 Dako) est déposé dans chaque puits et incubé pendant 1 heure à 37°C. La plaque est lavée 3 fois avec du PBS + 0,1 % de tween-20. Un volume de 100 µL de 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine, Fluka (TMB), tampon citrate et H₂O₂ est déposé dans chaque puits durant 5 minutes. La réaction est stoppée à l'aide d'H₂SO₄ 1M. Enfin la lecture de la plaque se fait à 450 nm.

5.3 Dosage des D-Dimères chez les patients MICI

Le dosage des D-dimères a été réalisé suivant les indications du fournisseur avec du plasma citrate (kit ASSERACHROM® D-DI référence 00947 Stago). Les résultats sont exprimés en équivalent fibrinogène initial (FEU). 500 ng/mL FEU correspond à environ 250 ng/mL de D-Dimères.

5.4 Dosage du TFPI total chez les patients MICI

Le dosage du TFPI total a été réalisé suivant les indications du fournisseur avec du plasma citrate (kit ASSERACHROM® TOTAL TFPI référence 00261 Stago).

5.5 Dosage du complexe ADN-Myéloperoxydase (MPO) pour le dosage des NETS chez la souris

Le complexe ADN-myéloperoxydase (MPO) a été dosé à l'aide du kit Cell Death detection Elisa (référence 11544675001 Sigma) et de l'anticorps anti-MPO (référence 07-496-I Millipore) dans du plasma citraté. Toutes les solutions et réactifs utilisés proviennent du kit Cell Death detection ELISA.

Il faut *coater* la plaque la veille de l'expérience avec l'anti-MPO à 5 µg/mL dans du tampon coating. Le lendemain, il faut faire 3 lavages avec la solution de lavage et déposer 200 µL de tampon d'incubation dans les puits pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, il faut refaire 3 lavages avec la solution de lavage et déposer 40 µL de plasma à tester dans les puits ainsi que le contrôle positif dilué au 1 :16, 1 :32 et 1 :64 et incuber pendant 1 heure 30 à température ambiante. Refaire 3 lavages avec la solution de lavage et déposer 80 µL d'anti-ADN-POD (va se lier à l'ADN simple brin et à l'ADN double brins) dilué dans du tampon d'incubation et incuber 1 heure 30 à température ambiante. Pour finir, il faut faire 3 lavages avec la solution de lavage puis 2 lavages avec du tampon acétate citrate (CH_3COONa , $3\text{H}_2\text{O}$ à 140 mM et ajuster à pH 6,0 avec de l'acide citrique 0,1M) et déposer 100 µL de TMB par puits et arrêter la réaction après 5 minutes avec 25 µL d' H_2SO_4 2M. Enfin la lecture de la plaque se fait à 450 nm.

5.6 Dosage du complexe ADN-Histone pour le dosage des NETS chez la souris

Le complexe ADN-Histone a été dosé avec le kit Cell Death Elisa PLUS (référence 11774425001 Sigma) dans du plasma citraté. Toutes les solutions et réactifs utilisés proviennent du kit Cell Death detection ELISA.

Pour commencer, il faut déposer 80 µL d'anti-histone dans chaque puits et incuber 2 heures à température ambiante. Puis, faire 1 lavage avec le tampon d'incubation et déposer 50 µL de plasma à tester et le contrôle positif dilué au 1 :16, 1 :32 et 1 :64 et incuber 1 heure 30 à température ambiante. Ensuite, faire 1 lavage avec le tampon d'incubation et déposer 80 µL d'anti-ADN-POD dilué dans du tampon d'incubation et incuber 1 heure à température ambiante. Pour finir, il faut faire 2 lavages avec le tampon d'incubation et 2 lavages avec du tampon acétate citrate et déposer 100 µL de TMB par puits et arrêter la réaction après 5 minutes avec 25 µL d' H_2SO_4 2M. Enfin la lecture de la plaque se fait à 450 nm.

6. Cytométrie en flux sur du sang de souris

6.1 Activation des plaquettes en sang total

Le sang a été prélevé en intracardiaque chez la souris (procédure d'anesthésie décrit dans la partie 2.5.1) mais avec l'ajout de PPACK qui est un inhibiteur de la thrombine (80 µM Sigma Aldrich) pour compléter le citrate et diluer dans le tampon Tyrode (dilution 1 :20) (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 0,3 mM NaH_2PO_4 , 5,5 mM glucose, 5 mM HEPES, 12 mM NaHCO_3 , 1 mM MgCl_2 , pH 7,4). Dans 20 µL de sang dilué, 5 µL d'anticorps GPIIb/IIIa-FITC (Emfret, #M040) ont été ajoutés pour ne marquer que les plaquettes, 5 µL d'anticorps CD62P-B421V (référence 564289 BD Horizon™), 5 µL d'anticorps Annexin V-PE CF594 (référence 563544 BD Horizon™), 5 µL de JON/A-PE (référence #M023-2 Emfret) ou 5 µL de CD41/61-PE (référence Leo. F2 #M025-2 Emfret). Le tampon Tyrode a été ajouté pour obtenir un volume final de 100 µL. Le tout est incubé pendant 30 minutes à l'obscurité à 37°C. La réaction est arrêtée avec 300 µL de tampon Tyrode et les échantillons ont été analysés avec le cytomètre Celesta (Becton Dickinson). Les données de cytométrie en flux ont été analysées avec le logiciel Kaluza analysis 2.1.

6.2 Quantification des plaquettes procoagulantes en sang total

Après prélèvement en intracardiaque, 15 μL de sang citraté ont été mis en présence de GPRP et de CaCl_2 à 2,5 mM. Le sang est activé pendant 10 minutes avec du collagène à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, du TRAP-6 à 50 μM ou la combinaison des deux : collagène + Trap. Après 10 minutes, la réaction est stoppée avec 380 μL d'HBSS (solution saline équilibrée de Hank). Pour la lecture au cytomètre, 3 tubes par condition sont préparés : un tube négatif sans anticorps, un tube avec GPIIb β -FITC, CD62P-B421V, Annexin V-PE CF594 et CD41/61-PE ou JON/A-PE avec les mêmes quantités indiquées en 6.1 et avec 15 μL de sang activé. Incuber le sang avec les anticorps pendant 1 heure à 37°C dans le noir et stopper la réaction avec 300 μL d'HBSS. Les échantillons ont été analysés avec le cytomètre Celesta (Becton Dickinson). Les données de cytométrie en flux ont été analysées avec le logiciel Kaluza analysis 2.1.

7. Analyses statistiques

La totalité des résultats sont exprimés en \pm Erreur Standard à la Moyenne (SEM). Avant chaque test statistique, un test de normalité est réalisé. Si les échantillons suivent la loi normale, un t-test ou un Anova 1 facteur est réalisé. Si les échantillons ne suivent pas la loi normale, un test de Mann-Whitney ou un Kruskal Wallis est réalisé. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.00.

PARTIE 4 : RESULTATS

1. Étude I-BANK

Le tableau 5 montre les caractéristiques cliniques des patients inclus dans la cohorte I-BANK. Environ un tiers des patients sont sous anti-TNF α (30 %), 26% sous anti-IL12/23, 6 % sous anti-intégrine $\alpha_4\beta_7$. Quelques patients avec une RCH prennent des anti-JAK (5 %) et d'autres prennent des anti-inflammatoires 5-ASA, des corticoïdes, des anti-diarrhéiques ou des antibiotiques (23 %), enfin 16% des patients de la cohorte I-BANK sont en rémission prolongée.

	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique
Sexe	42 femmes 29 hommes	14 femmes 10 hommes
Age à l'inclusion (années)	40 \pm 11	45 \pm 14
Poids (kg)	71,2 \pm 16,6	77,8 \pm 13,9
Taille (cm)	169 \pm 9,7	170 \pm 9,0
Antécédents familiaux de MICI, n (%)	5 (7,0)	5 (20,8)
Antécédents chirurgicaux, n (%)	37 (52,1)	5 (20,8)
Fumeur, n (%)	20 (28,1)	3 (12,5)
Traitement anti-TNFα (infliximab, adalimumab), n (%)	26 (36,6)	3 (12,5)
Traitement anti-IL12/IL23 (ustekinumab), n (%)	21 (29,6)	3 (12,5)
Traitement anti-intégrine $\alpha_4\beta_7$ (védolizumab), n (%)	3 (4,2)	3 (12,5)
Traitement anti-JAK (filgotinib, tofacitinib), n (%)	1 (1,4)	4 (16,6)
Autres traitements (corticoïde, antibiotique, 5-ASA, immunosuppresseur), n (%)	8 (11,3)	14 (58,3)
Rémission prolongée, n (%)	13 (18,3)	3 (12,5)

Tableau 5 : Caractéristiques cliniques des patients de la cohorte I-BANK

71 patients atteints de la maladie de Crohn et 24 patients atteints d'une rectocolite hémorragique. Les résultats sont exprimés en nombre et en pourcentage \pm SEM.

Concernant les paramètres sanguins, il n'y a pas de différence significative entre les patients ayant une MC et les patients ayant une RCH (tableau 6).

	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique	P valeur
Globules rouges ($10^6/ \text{mm}^3$)	4,3 ± 0,1	4,2 ± 0,1	NS
Globules blancs ($10^3/ \text{mm}^3$)	6,9 ± 0,2	7,2 ± 0,6	NS
Hématocrite (%)	38,6 ± 0,6	38,7 ± 1	NS
Hémoglobine (g/dL)	12,9 ± 0,2	13,1 ± 0,3	NS
VGM (μm^3)	90,5 ± 1,3	92,4 ± 1,1	NS
Plaquettes ($10^3/ \text{mm}^3$)	256 ± 9	275 ± 20	NS
VPM (μm^3)	6,5 ± 0,1	6,46 ± 0,1	NS
Granulocytes (%)	65,5 ± 1,3	66,4 ± 2,1	NS
Lymphocytes (%)	27,8 ± 1,2	27,7 ± 2	NS
Monocytes (%)	6,4 ± 0,3	5,8 ± 0,4	NS

Tableau 6 : Numération sanguine chez les patients de la cohorte I-BANK

Numération sanguine chez les patients de la cohorte I-BANK. VGM : Volume globulaire moyen, VPM : Volume plaquettaire moyen. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, MC n = 67, RCH n = 21.

1.1 Génération de thrombine en plasma riche et pauvre en plaquettes chez les patients MICI de la cohorte I-BANK

1.1.1 Plasma riche en plaquettes

La génération de thrombine réalisée avec du PRP permet l'étude de la coagulation en fonction d'un seul type cellulaire : les plaquettes. La figure 13A montre des courbes typiques de génération de thrombine en PRP chez une personne contrôle et chez une personne atteinte de MICI. Les paramètres de génération de thrombine comme l'ETP ne montrent pas de différence significative entre les deux groupes (1398 ± 35 vs 1470 ± 34 nM.min) alors que la quantité de thrombine (pic) générée est plus importante ($178 \pm 6,0$ vs $83,1 \pm 4,8$ mM) chez les patients atteints de MICI par rapport à des personnes contrôles (figure 13B et 13C).

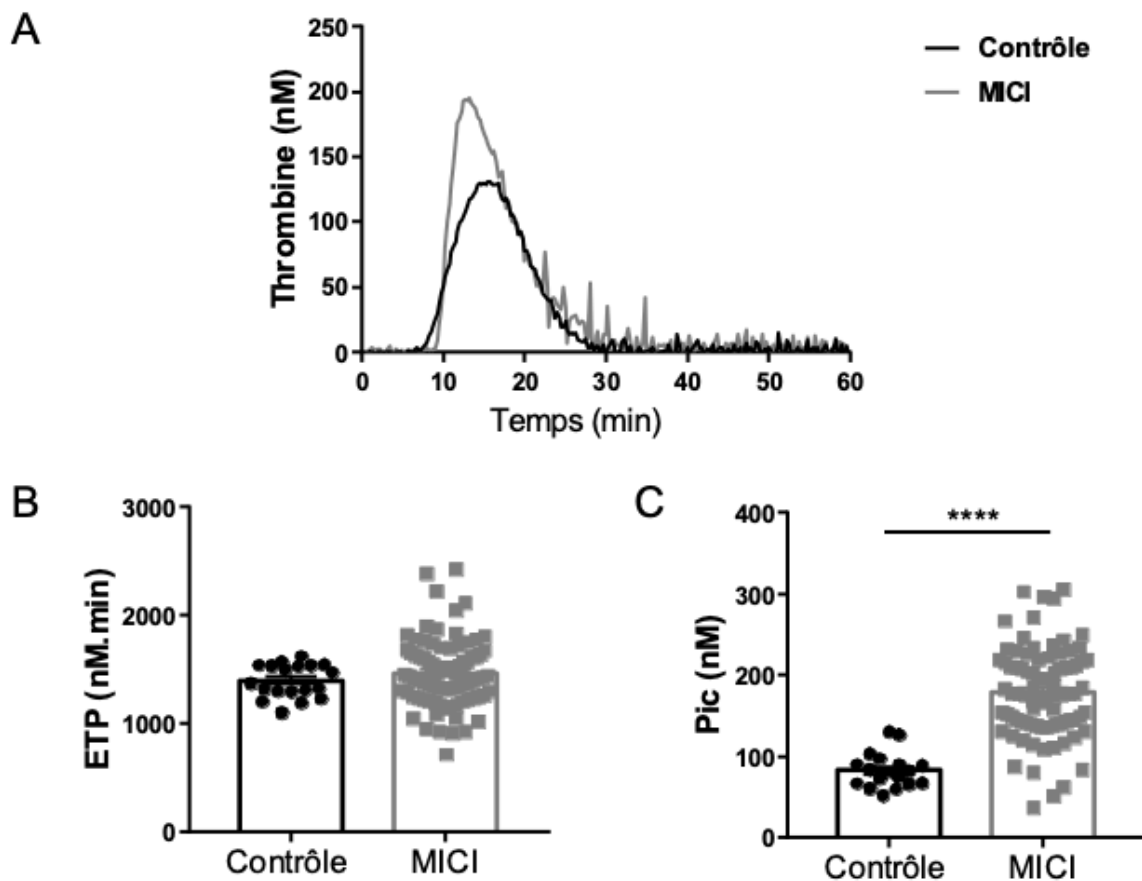


Figure 13 : Génération de thrombine en plasma riche en plaquettes chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK

Profil des courbes de génération de thrombine (A). Valeurs des ETP chez les deux groupes (B). Valeurs maximales de thrombine générée (pic) (C). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; **** $p < 0,0001$; $n = 19$ pour les sujets contrôles et $n = 85$ pour les patients de la cohorte I-BANK.

1.1.2 Plasma pauvre en plaquettes

Ensuite, la génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes a été réalisée. Plus aucun type cellulaire n'est présent dans le plasma.

La figure 14A montre des courbes typiques de génération de thrombine chez une personne contrôle et chez une personne atteinte de MICI. Les paramètres de génération de thrombine montrent une génération de thrombine plus importante chez les patients atteints de MICI par rapport à des personnes contrôles (figure 14B et 14C). Les personnes contrôles ont un ETP à 966 ± 99 nM.min avec un pic à 175 ± 30 nM alors que les patients MICI ont un ETP augmenté à 1339 ± 35 nM.min avec un pic à 278 ± 11 nM.

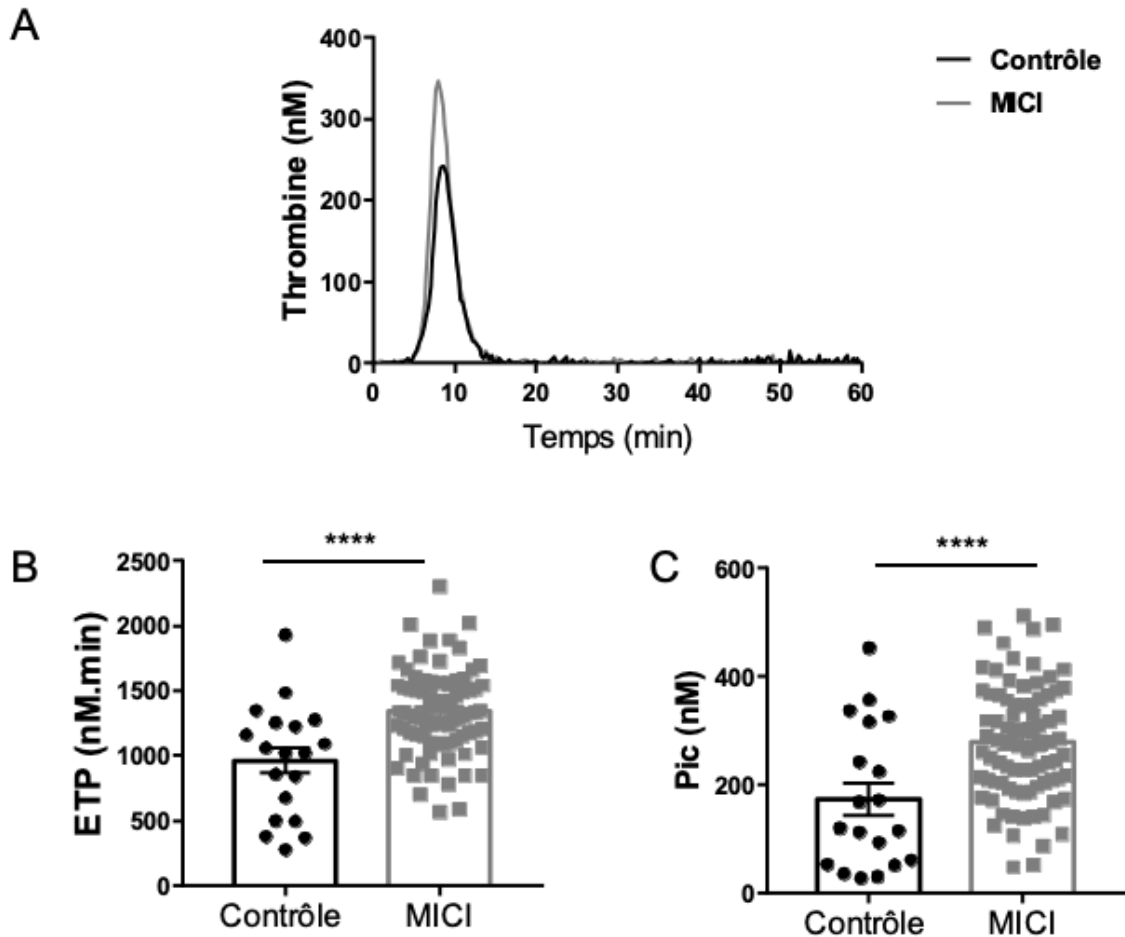


Figure 14 : Génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK

Profil des courbes de génération de thrombine (A). Valeurs des ETP chez les deux groupes (B). Valeurs maximales de thrombine générée (pic) (C). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; **** $p < 0,0001$; $n = 19$ pour les sujets contrôles et $n = 84$ pour les patients de la cohorte I-BANK.

1.2 Agglutination plaquettaire chez les patients de la cohorte I-BANK

Sur des frottis sanguins, il a été mesuré un nombre plus important d'amas plaquettaires chez les patients MICI par rapport à des personnes contrôles (*figure 15*). La quantification des amas plaquettaires sur les frottis sanguins a été faite sur 5 champs différents chez 7 contrôles et 17 patients de la cohorte I-BANK représentatifs de la cohorte en termes d'âge, de sexe et d'activité de la maladie. Il y a une augmentation significative des petits amas (2 à 5 plaquettes) chez les patients MICI ($16,4 \pm 2$ vs $2,4 \pm 1$ amas) (*figure 16A*). Pour les amas supérieurs à 5 plaquettes, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes ($p = 0,28$) (*figure 16B*).

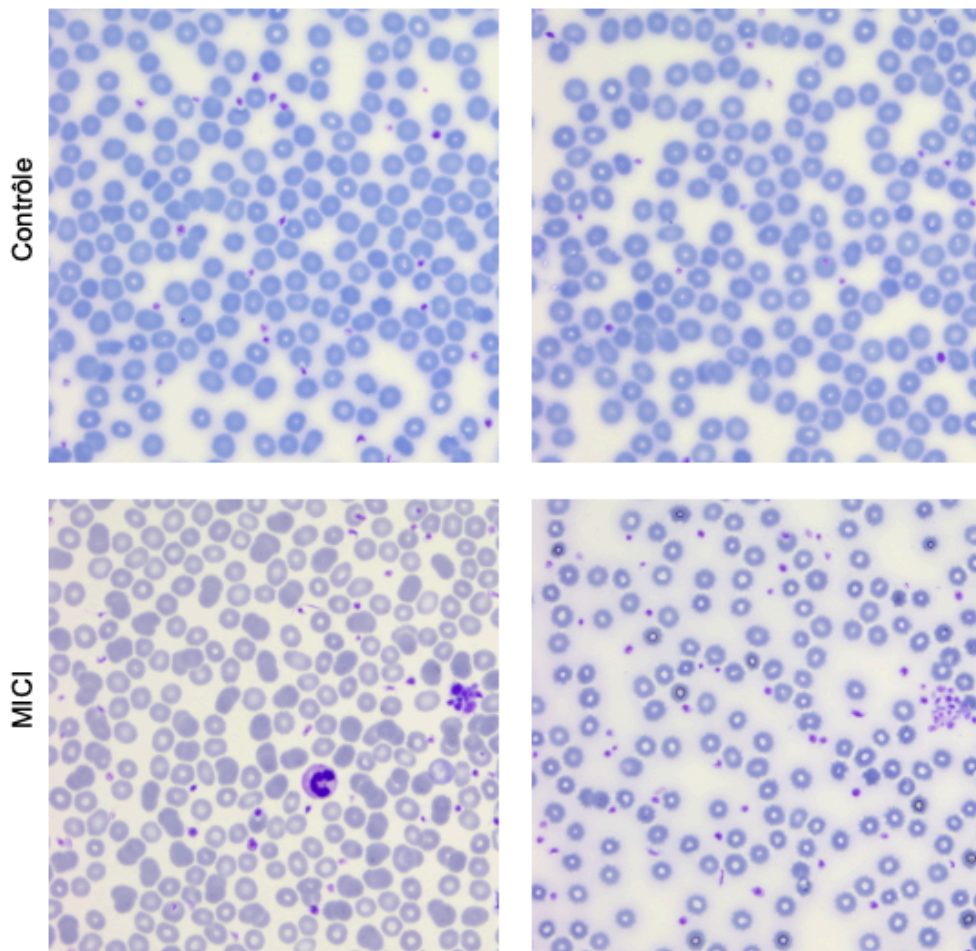


Figure 15 : Photos de frottis sanguin de sujets contrôles et de patients de la cohorte I-BANK après coloration au MGG

Photos prises au microscope à immersion objectif x40, $n = 7$ pour les sujets contrôles, $n = 17$ pour les patients de la cohorte I-BANK.

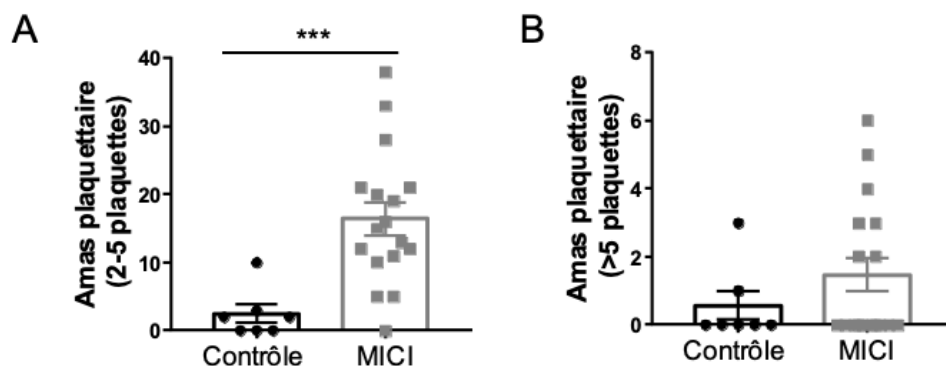


Figure 16 : Quantification des amas plaquettaire chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK

Les amas ont été quantifiés en 2 catégories : 2 à 5 plaquettes par amas (A) et > à 5 plaquettes (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $***p < 0,001$, $n = 7$ pour les sujets contrôles, $n = 17$ pour les patients de la cohorte I-BANK.

1.3 Dosage plasmatique du facteur VWF chez les patients de la cohorte I-BANK

L'un des acteurs majeurs de l'agglutination des plaquettes étant le facteur VWF, nous avons mesuré sa présence sous forme totale et sous forme active chez les patients de la cohorte I-BANK et chez des personnes contrôles. Les concentrations plasmatiques en facteur VWF antigénique (*figure 17A*) sont significativement augmentées chez les patients atteints de MICI ($153,1 \pm 6,4$ vs $86,1 \pm 5,1\%$). Le dosage du facteur VWF sous sa forme active permet de mettre en évidence spécifiquement sa conformation permettant une liaison au récepteur GPIIb/IIIa. Sur 88 patients, 19 soit 21,6% possèdent du facteur VWF sous sa forme active (*figure 17B*). Les personnes contrôles ne possèdent pas de facteur VWF actif, alors que les patients MICI ayant des quantités détectables de facteur VWF actif ont des concentrations variant d'un facteur 10 ($1,4 - 14,6 \mu\text{g/mL}$) pour une moyenne de $5,7 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$.

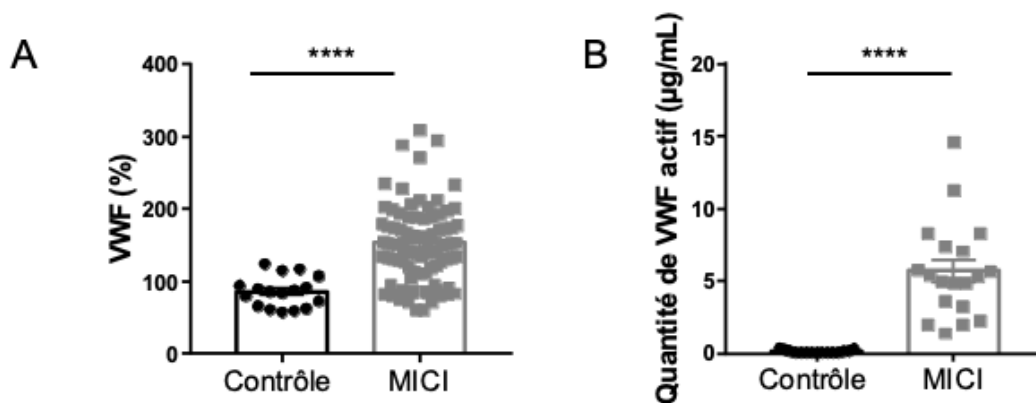


Figure 17 : Dosage du VWF total et du VWF actif chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK

*Dosage du facteur VWF : Ag (A). Dosage du facteur VWF sous sa forme active (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n = 17$ pour les sujets contrôles VWF : Ag et $n = 88$ pour les patients de la cohorte I-BANK. Pour Le dosage du VWF actif $n = 15$ pour les sujets contrôles et $n = 19$ pour les patients de la cohorte I-BANK, **** $p < 0,0001$.*

1.4 Dosage plasmatique des D-Dimères chez les patients de la cohorte I-BANK

Les D-Dimères représentent des fragments de fibrine dans le caillot sanguin. Ils vont se retrouver dans le sang lors de la fibrinolyse et vont pouvoir être quantifiés et caractérisés pour détecter une inflammation. Chez nos patients, on ne retrouve pas d'augmentation significative de D-Dimères comparé à des personnes contrôles (*figure 18*, $p = 0,06$).

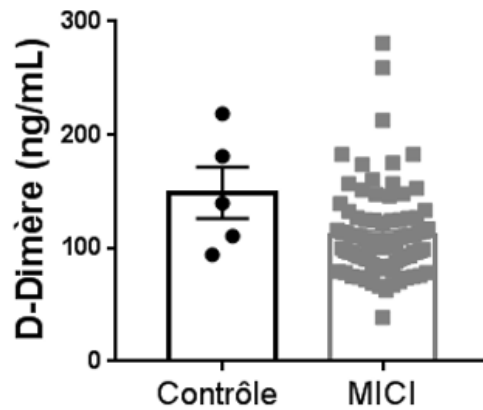


Figure 18 : Dosage des D-Dimères chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n = 5$ pour les sujets contrôles et $n = 87$ pour les patients de la cohorte IBANK.

1.5 Dosage plasmatique du TFPI total chez les patients de la cohorte I-BANK

Le TFPI est un régulateur négatif de la coagulation (anticoagulant). Il n'y a pas d'augmentation du TFPI total chez les patients MICI (figure 19).

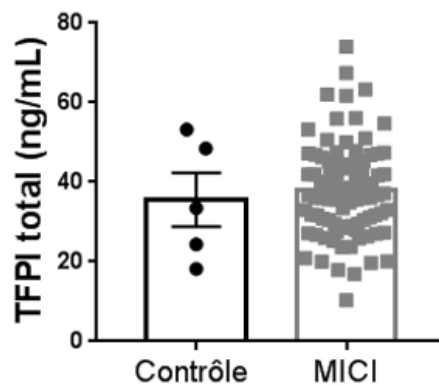


Figure 19 : Dosage du TFPI total chez des sujets contrôles et chez les patients de la cohorte I-BANK

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n = 5$ pour les sujets contrôles et $n = 88$ pour les patients de la cohorte I-BANK.

2. Caractérisation de la coagulation chez des souris traitées au DSS

Pour étudier plus en détail l'implication des plaquettes dans le phénotype procoagulant provoqué par les MICI, nous avons utilisé le modèle de colite induite par le DSS. Les souris ont un nombre de plaquettes plus important que l'homme. Les souris traitées au DSS montrent une augmentation du nombre de plaquettes caractéristique d'un état inflammatoire (1084 ± 82 vs $785 \pm 24 \cdot 10^3 / \text{mm}^3$). Les souris traitées au DSS ont un volume globulaire moyen plus faible que les souris contrôles ($45,5 \pm 0,1$ vs $47,5 \pm 0,2 \mu\text{m}^3$) (tableau 7).

	Contrôle	DSS	P valeur
Globules rouges ($10^6 / \text{mm}^3$)	$9,5 \pm 0,1$	$9,2 \pm 0,2$	NS
Globules blancs ($10^3 / \text{mm}^3$)	$3,0 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,5$	NS
Hématocrite (%)	$45,4 \pm 0,6$	$41,9 \pm 1,1$	NS
Hémoglobine (g/dL)	$14,1 \pm 0,2$	$13,3 \pm 0,3$	NS
VGM (μm^3)	$47,5 \pm 0,2$	$45,5 \pm 0,1$	****
Plaquettes ($10^3 / \text{mm}^3$)	785 ± 24	1084 ± 82	**
VPM (μm^3)	$6,6 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,4$	NS
Granulocytes (%)	$2,8 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,3$	NS
Lymphocytes (%)	$87,5 \pm 1,0$	$84,6 \pm 1,7$	NS
Monocytes (%)	$9,7 \pm 1,1$	$13,4 \pm 0,3$	NS

Tableau 7 : Numération sanguine chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

Les résultats sont exprimés en \pm SEM, ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$, $n = 18$ pour les souris contrôles et $n = 18$ pour les souris traitées au DSS.

2.1 Évolution de la sévérité de la colite chez la souris

Les souris ont été suivies quotidiennement pendant 8 jours pour contrôler la perte de poids, l'aspect des selles et la présence ou non de rectorragie. Une moyenne a été faite par cage et par groupe afin d'établir le DAI (figure 20). Au cours du traitement, le score d'activité de la maladie augmente chez les souris recevant du DSS. À la suite du traitement, le groupe DSS a une perte de poids au cours des 8 jours.

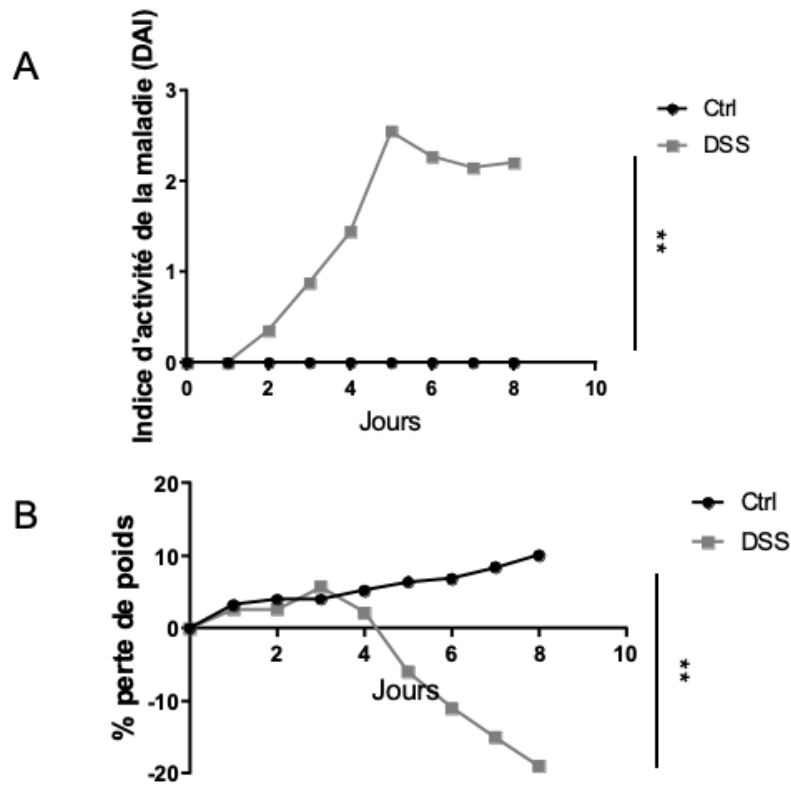


Figure 20 : Suivi quotidien chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

Score d'activité de la maladie durant le traitement (A). Perte de poids observé durant le traitement (B).
 ** $p < 0,01$, $n = 18$ pour les souris contrôles et $n = 18$ pour les souris traitées au DSS.

Le dosage de la lipocaline 2 sur des lysats de colon a été réalisé pour évaluer l'état de la colite (figure 21).

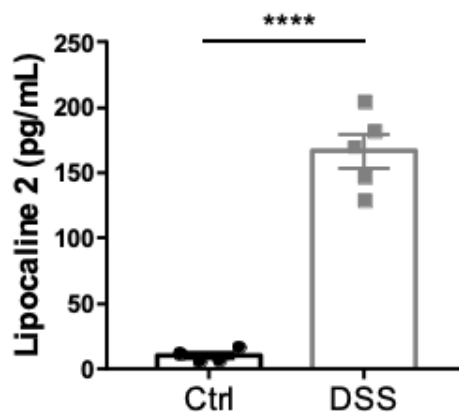


Figure 21 : Dosage de la lipocaline chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n = 4$ pour les souris contrôles et $n = 5$ pour les souris traitées au DSS.

La coloration en HES des coupes de colon a également été utilisée pour établir un score de sévérité de la colite dans chaque groupe de souris (*figure 22*). L'analyse a été faite en aveugle selon l'index histologique de Nancy ⁴².

Les lésions sont plus importantes avec une infiltration de cellules immunitaires et une destruction des cryptes chez les souris traitées au DSS (*tableau 8*).

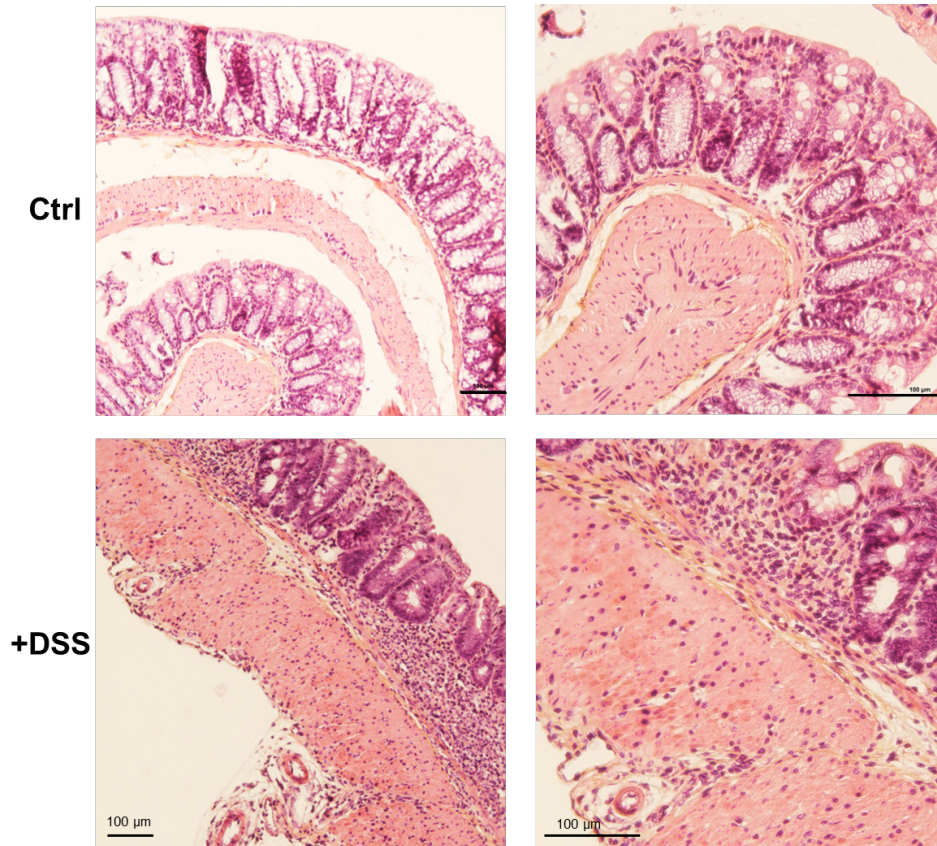


Figure 22 : Coupes de colon d'une souris contrôle et d'une souris traitée au DSS après coloration HES

Photos prises au microscope x20 et x40, n = 18 pour les souris contrôles et n = 18 pour les souris traitées au DSS.

	Contrôle	DSS
Grade selon l'index histologique de Nancy	Normal	Modéré et sévère
Signe d'activité inflammatoire	Non	Élevée
Extension de l'infiltrat inflammatoire	-	Muqueuse
Microthrombi	Non	Non
Description	Structure normale	Destruction des cryptes, œdème de la muqueuse et la sous-muqueuse, distorsion et dystrophie des glandes

Tableau 8 : Analyse faite par l'anatomopathologiste des coupes HES de colon selon l'index histologique de Nancy (lecture en l'aveugle)

2.2 Génération de thrombine chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

2.2.1 Plasma riche en plaquettes

La figure 23A montre des courbes de génération de thrombine typique d'une souris contrôle et d'une souris traitée au DSS. La génération de thrombine en PRP est augmentée chez les souris traitées au DSS comparé aux souris contrôles ($668 \pm 16,7$ vs $408 \pm 20,0$ nM.min) (*figure 23B*). La quantité maximale de thrombine générée est plus importante chez les souris traitées au DSS ($70,4 \pm 4,2$ vs $33,3 \pm 2,2$ nM) (*figure 23C*).

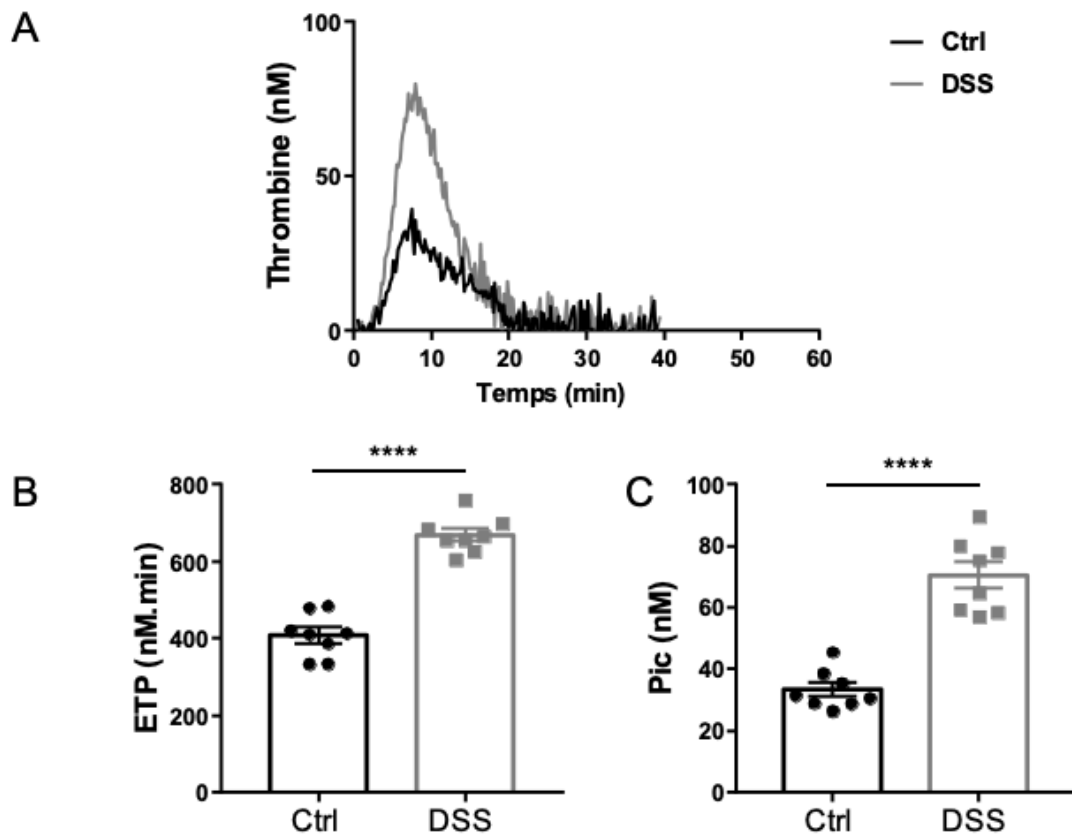


Figure 23 : Génération de thrombine chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS sur plasma riche en plaquettes

Profil des courbes de génération de thrombine (A). Valeurs des ETP chez les deux groupes (B). Valeurs maximales de thrombine générée (pic) (C). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; **** $p < 0,0001$, $n = 8$ pour les souris contrôles et $n = 8$ pour les souris traitées au DSS.

2.2.2 Plasma pauvre en plaquettes

La génération de thrombine en PPP n'a pas montré de différence significative entre les souris contrôles et les souris traitées au DSS. Les courbes typiques de génération de thrombine sont similaires (figure 24A). L'ETP ne montre pas de différence entre les deux groupes ($316 \pm 12,2$ vs $307 \pm 18,7$ nM.min) (figure 24B). La quantité maximale de thrombine générée ne montre pas de différence ($33,2 \pm 2,4$ vs $29,2 \pm 4,4$ nM) (figure 24C).

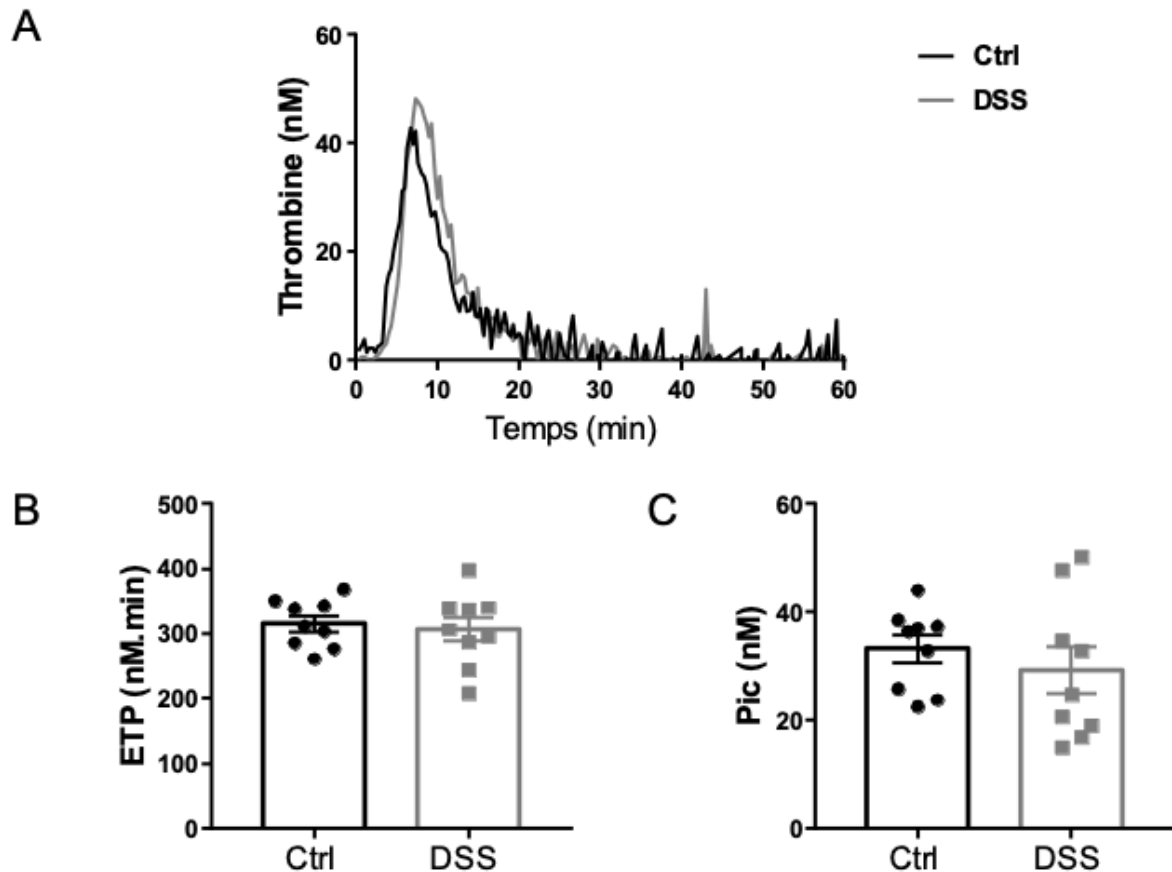


Figure 24 : Génération de thrombine chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS sur plasma pauvre en plaquettes

Profil des courbes de génération de thrombine (A). Valeurs des ETP chez les deux groupes (B). Valeurs maximales de thrombine générée (pic) (C). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n = 9$ chez les souris contrôles et $n = 9$ chez les souris traitées au DSS.

2.3 Activation plaquettaire en sang total chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

Pour approfondir l'étude des modifications des plaquettes, des mesures de l'activation des plaquettes en sang total ont été réalisées en cytométrie en flux.

La population plaquettaire a été ciblée à l'aide de l'anticorps anti-GPIIb/IIIa. L'état d'activation a été évalué grâce à la P-sélectine, l'annexine V, CD41/61 et JON/A. Aucune différence significative d'activation plaquettaire n'a été observée entre les deux groupes en sang total non stimulé (figure 25).

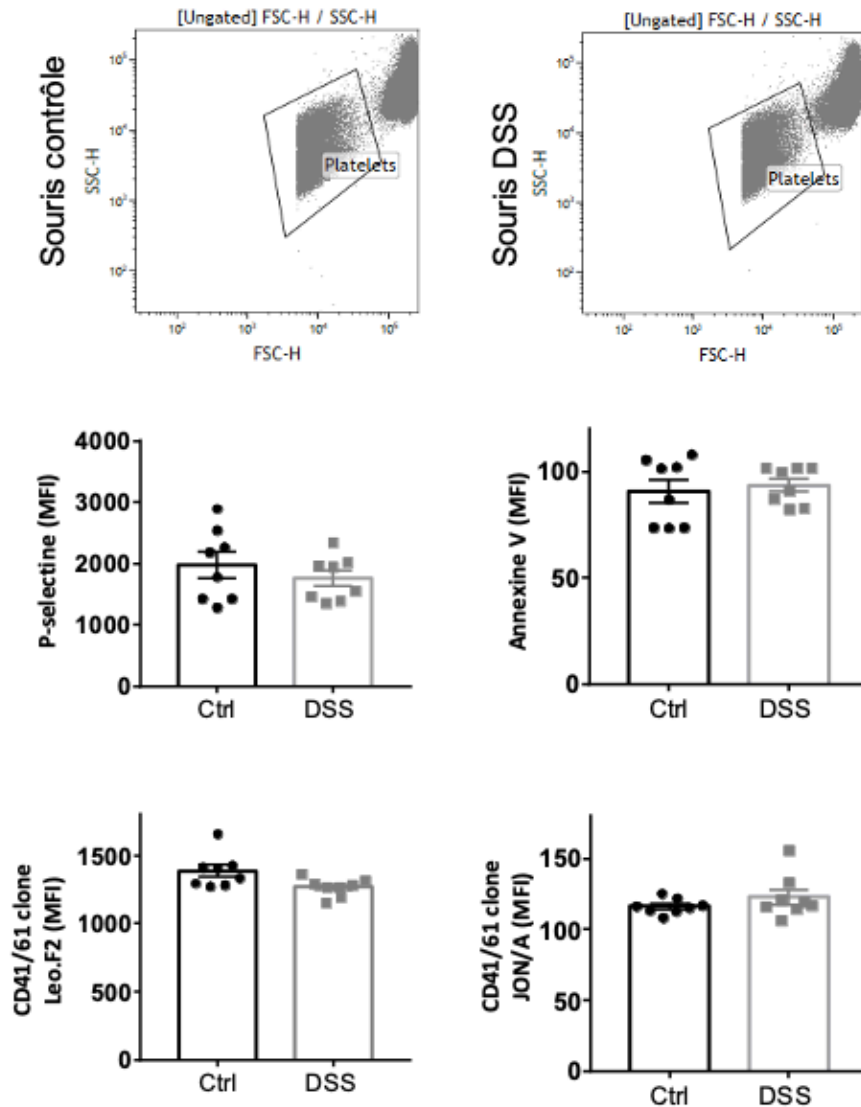


Figure 25 : Analyse de l'activation plaquettaire en sang total par cytométrie en flux chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

La population plaquettaire a été ciblée avec GPIIb β et l'activation plaquettaire a été évaluée avec la sélectine P, l'Annexine V et les formes inactivées/activées de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$: CD41/61 (GPIIb/IIIa) et JON/A (GPIIb/IIIa). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, n = 8 pour les souris contrôles et n = 9 pour les souris traitées au DSS.

2.4 Évaluation de l'exposition de PS, de P-selectine et d'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface des plaquettes par cytométrie en flux

Les mesures de la PS, de la P-sélectine et de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ permettent d'évaluer le pouvoir procoagulant des plaquettes. Après activation des plaquettes par du collagène, du TRAP-6 ou la combinaison des deux, il n'y a pas de différence entre les deux groupes (*figure 26*). La pré-activation des plaquettes avec différents agonistes n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation du potentiel procoagulant des plaquettes de souris traitées au DSS.

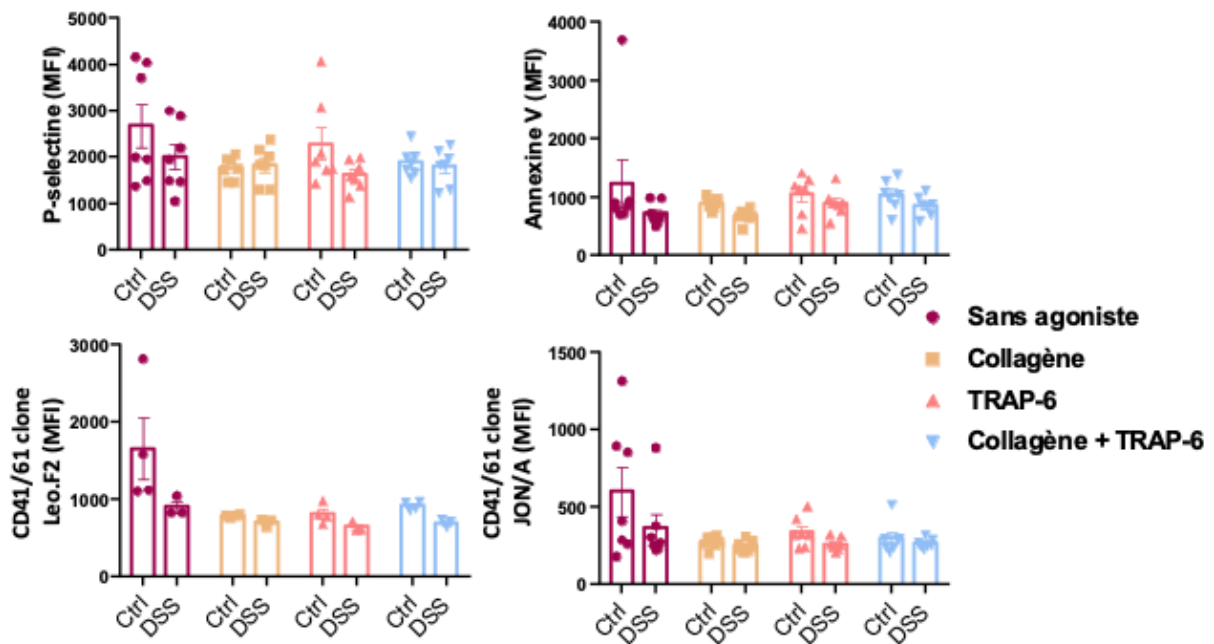


Figure 26 : Analyse par cytométrie en flux de l'activité procoagulante et de l'état d'activation des plaquettes chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n = 7$ pour les souris contrôles et DSS excepté pour le marqueur CD41 $n = 4$ pour les contrôles et $n = 3$ pour les souris DSS.

2.5 Capacité des plaquettes à adhérer après activation

Les différentes stimulations n'ont pas permis de montrer de différence entre les plaquettes de souris contrôles et les plaquettes de souris traitées au DSS en ce qui concerne leur capacité d'adhésion (figure 27-28).

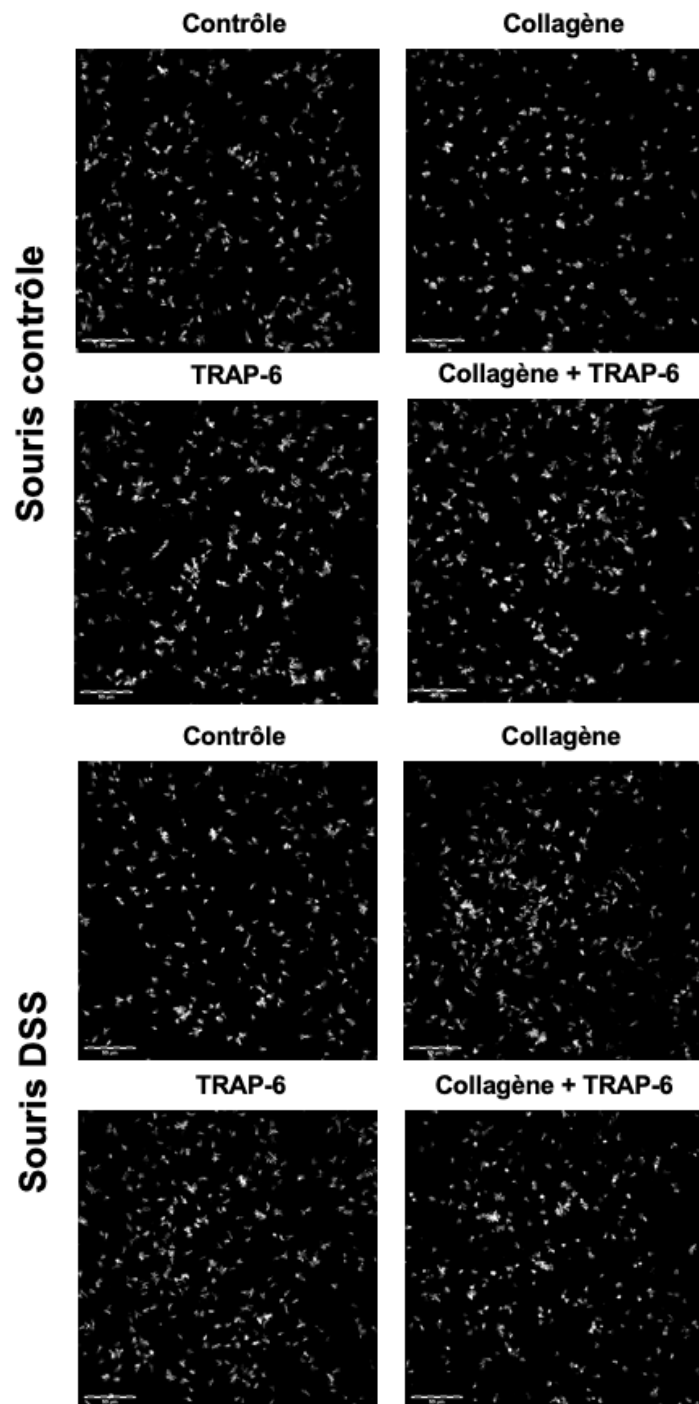


Figure 27 : Photos de plaquettes après activation chez une souris contrôle et chez une souris traitée au DSS

Photos prises au microscope objectif x60.

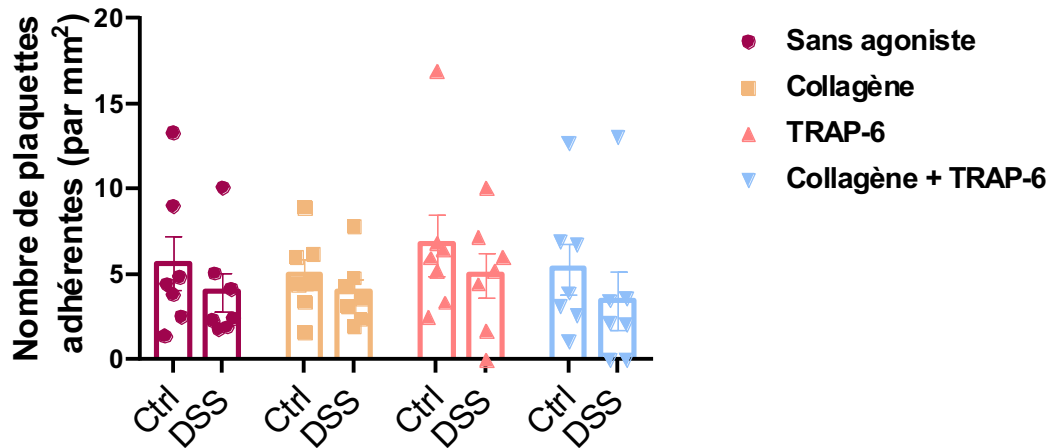


Figure 28 : Quantification du nombre de plaquettes adhérentes par mm² après activation chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, n = 7 pour les souris contrôles et traitées au DSS.

2.6 Agglutination plaquettaire chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

Les plaquettes ont tendance à former des amas en condition pathologique et ont un rôle à jouer dans l'étude de la coagulation. Sur des frottis sanguins avec coloration au MGG (figure 29A), il a été observé que les plaquettes des souris traitées au DSS formaient plus facilement des petits et des gros amas plaquettaire comparé aux souris contrôles (figure 29B).

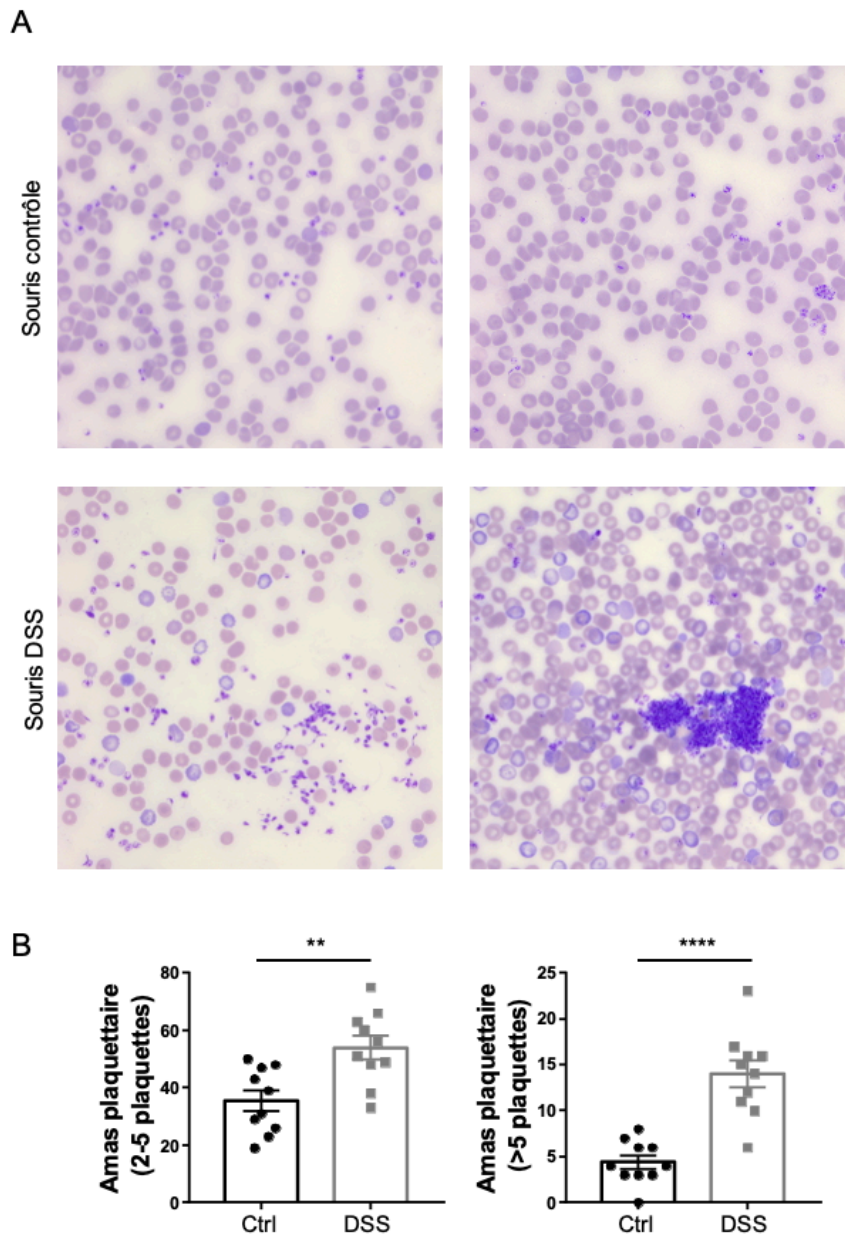


Figure 29 : Frottis sanguin chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

Photos de frottis sanguin prises au microscope objectif x40 à immersion (A). Amas plaquettaire comptaient sur 5 champs différents en 2 catégories : amas de 2 à 5 plaquettes et amas de plus de 5 plaquettes (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, ** $p < 0,01$ et **** $p < 0,0001$, $n = 10$ pour les souris contrôles et $n = 10$ pour les souris traitées au DSS.

2.7 Dosage plasmatique du facteur VWF chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

Le facteur VWF est un élément central de l'hémostase et a un rôle important à jouer dans la régulation de l'inflammation. La tendance est à l'augmentation du facteur VWF ($p = 0,057$) dans le groupe de souris traitées au DSS par rapport aux souris contrôles ($15,4 \pm 3,1$ vs $8,4 \pm 1,3$ U/mL) (figure 30).

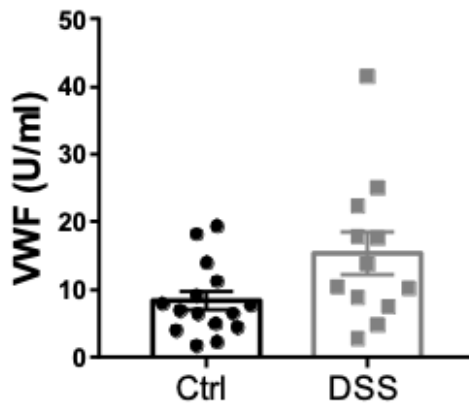


Figure 30 : Dosage du facteur VWF chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $p = 0,057$ $n = 15$ pour les souris contrôles et $n = 12$ pour les souris traitées au DSS.

2.8 Dosage plasmatique des complexes ADN-MPO et ADN-Histone chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

La formation des NETs peut être mesurée grâce au complexe ADN-MPO et au complexe ADN-Histone. Il n'y a pas de différence significative pour le dosage de ces deux complexes entre les souris contrôles et les souris traitées au DSS (figure 31).

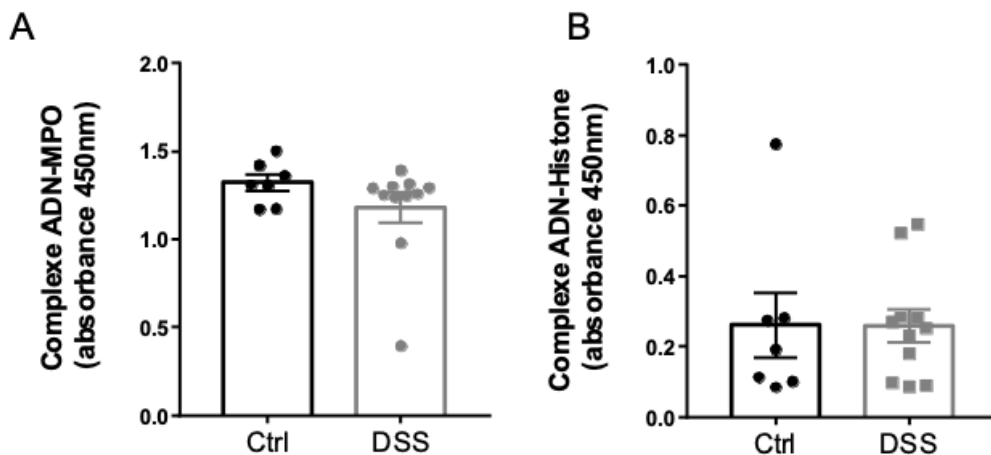


Figure 31 : Dosages des complexes ADN-MPO et ADN-Histone chez des souris contrôles et des souris traitées au DSS

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n = 7$ pour les souris contrôles et $n = 10$ pour les souris traitées au DSS pour ADN-MPO, $n = 6$ pour les souris contrôles et $n = 9$ pour les souris traitées au DSS pour ADN-Histone.

3. Étude de la coagulation chez des souris contrôles et VWF KO traitées ou non par du DSS

Pour compléter l'étude de l'implication du facteur VWF, des souris KO pour le facteur VWF ont été utilisées. La numération plaquettaire est similaire chez des souris contrôles et des souris VWF KO. Chez les souris contrôles traitées au DSS et VWF KO traitées au DSS, la numération plaquettaire tend à l'augmentation (*tableau 9*).

	VWF ^{+/+}	VWF ^{+/+} DSS	VWF ^{-/-}	VWF ^{-/-} DSS
Globules rouges (10⁶/ mm³)	8,1 ± 0,1	7,4 ± 0,4	7,8 ± 0,1	7,4 ± 0,4
Globules blancs (10³/ mm³)	2,4 ± 0,4	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,3	2,3 ± 0,2
Hématocrite (%)	38,7 ± 0,5	34,7 ± 1,9	36,8 ± 0,6	34,6 ± 1,3
Hémoglobine (g/dL)	12,4 ± 0,1	10,9 ± 0,6	11,7 ± 0,2	10,7 ± 0,4
VGM (µm³)	47,9 ± 0,4	46,5 ± 0,7	46,9 ± 0,7	47,3 ± 1,2
Plaquettes (10³/ mm³)	961 ± 75	1125 ± 81	1004 ± 60	1168 ± 62
VPM (µm³)	4,7 ± 0,04	4,8 ± 0,02	4,62 ± 0,03	4,71 ± 0,03
Granulocytes (%)	23,3 ± 1,9	26,0 ± 2,4	22,1 ± 1,4	21,3 ± 1,4
Lymphocytes (%)	73,1 ± 2,0	69,9 ± 2,9	74,6 ± 1,6	75,0 ± 1,6
Monocytes (%)	3,6 ± 0,2	4,1 ± 0,6	3,4 ± 0,3	3,7 ± 0,2

Tableau 9 : Numération sanguine chez des souris contrôles, contrôles traitées au DSS, VWF KO et VWF KO traitées au DSS

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Pas de différence significative entre les quatre groupes, n = 7 pour les groupes souris contrôles et VWF KO, n = 6 pour les souris contrôles traitées au DSS et n = 11 pour les souris VWF KO traitées au DSS.

3.1 Évolution de la sévérité de la colite chez des souris VWF KO traitées au DSS

Les souris ont été suivies quotidiennement pendant 8 jours pour contrôler la perte de poids, l'aspect des selles et la présence ou non de rectorragie. Une moyenne a été faite par cage et par groupe afin d'établir le score de la maladie (*figure 32A et B*).

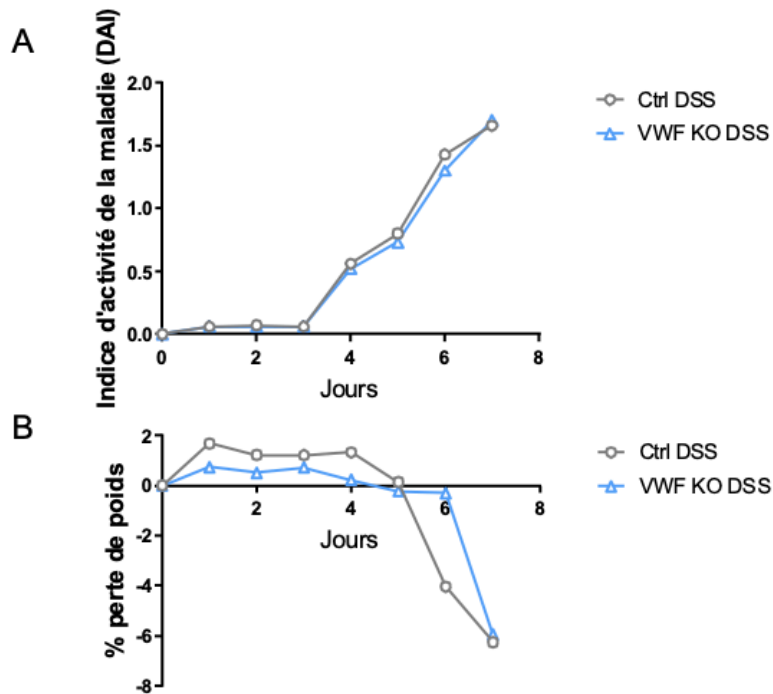


Figure 32 : DAI chez des souris contrôles traitées au DSS et des souris VWF KO traitées au DSS

N = 6 pour les souris contrôles traitées au DSS et n = 11 pour les souris VWF KO traitées au DSS.

Comme précédemment, la lipocaline est plus élevée chez les souris contrôles traitées au DSS par rapport aux souris contrôles non traitées au DSS ($57,3 \pm 14,6$ vs $5,3 \pm 0,6$ pg/mL).

Il n'y a pas de différence significative entre les souris contrôles traitées au DSS et les souris VWF KO traitées au DSS mais une tendance à l'augmentation ($57,3 \pm 14,6$ vs $83,0 \pm 8,2$ pg/ml) (*figure 33*).

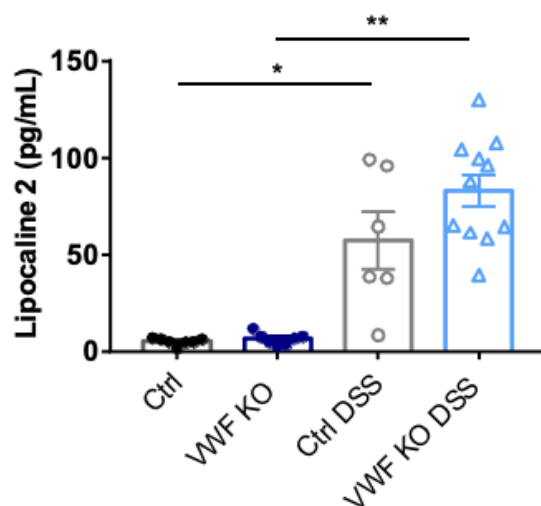


Figure 33 : Dosage de la lipocaline dans du lysat de colon chez la souris contrôle et la souris VWF KO traitée ou non au DSS

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$, $n = 7$ pour les groupes souris contrôles et VWF KO, $n = 6$ pour les souris contrôles traitées au DSS et $n = 11$ pour les souris VWF KO traitées au DSS.

3.2 Amas plaquettaires chez des souris contrôles traitées au DSS et des souris VWF KO traitées au DSS

Des photos de frottis sanguins ont été prises dans les 4 groupes (*figure 34*). La quantification des amas plaquettaires a été faite sur 5 champs différents. Il y a une augmentation du nombre de petits amas plaquettaires chez les souris traitées au DSS comparées aux souris contrôles (60 ± 4 vs 40 ± 3 amas avec $p = 0,1$) (*figure 35A*). Les souris VWF KO traitées au DSS présentent un nombre augmenté de petits amas par rapport aux souris VWF KO sans DSS (*figure 35A*). Pour les plus gros amas (supérieurs à 5 plaquettes), il y a une augmentation de leur nombre chez les souris contrôles traitées au DSS et chez les souris VWF KO traitées au DSS par rapport aux deux groupes sans DSS (*figure 35B*).

En regardant plus attentivement les deux groupes traités au DSS, il y a une tendance à la diminution du nombre de gros amas chez les souris VWF KO traitées au DSS par rapport aux souris contrôles traitées au DSS (7 ± 1 vs 13 ± 2 amas) (*figure 35B*).

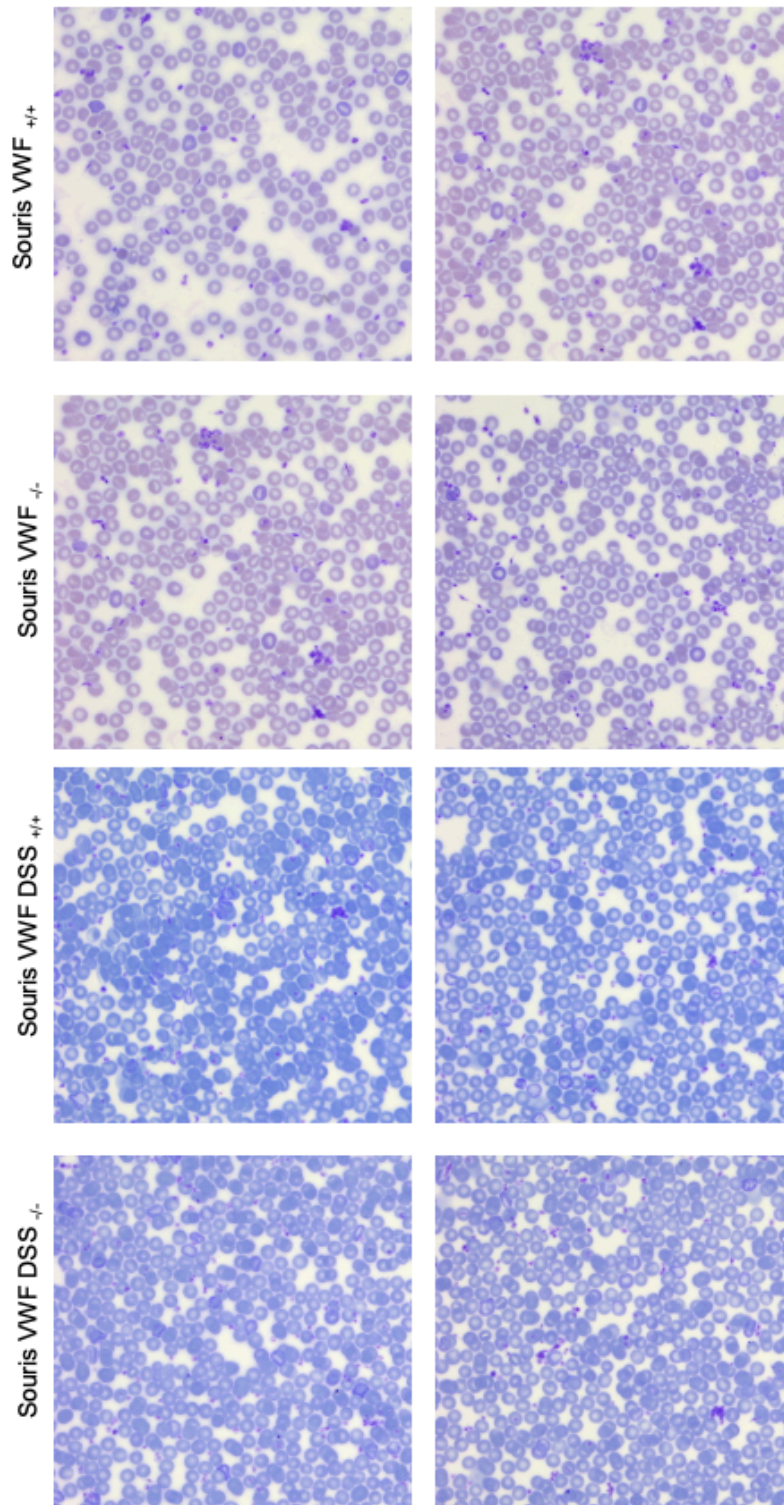


Figure 34 : Frottis sanguin de souris contrôles avec et sans DSS et de souris VWF KO avec ou sans DSS

Photos prises au microscope objectif x40 à immersion, n = 7 pour les groupes souris contrôles et VWF KO, n = 6 pour les souris contrôles traitées au DSS et n = 11 pour les souris VWF KO traitées au DSS.

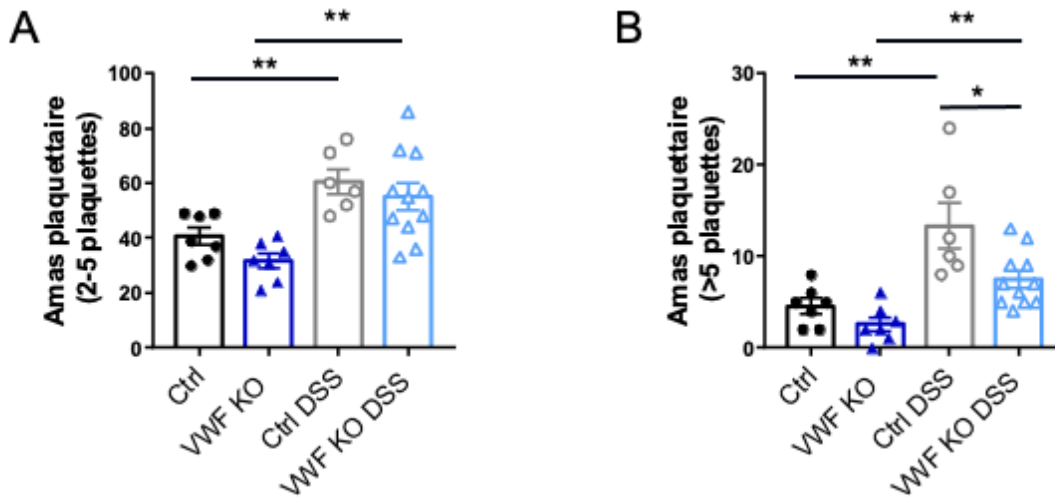


Figure 35 : Quantification des amas plaquettaire chez des souris contrôles traitées au DSS et VWF KO traitées au DSS

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; * p < 0,05, n = 7 pour les groupes souris contrôles et VWF KO, n = 6 pour les souris contrôles traitées au DSS et n = 11 pour les souris VWF KO traitées au DSS.

3.3 Génération de thrombine chez des souris contrôles traitées au DSS et VWF KO traitées au DSS

La figure 37A montre les courbes typiques de génération de thrombine des 4 groupes de souris. Comme précédemment, on retrouve une génération de thrombine augmentée chez les souris contrôles traitées au DSS par rapport aux souris contrôles ($331 \pm 52,6$ vs $240 \pm 33,1$ nM.min) (figure 36A et B). Le pic de génération de thrombine est également augmenté chez les souris traitées au DSS par rapport aux souris contrôles ($39,6 \pm 5,1$ vs $18,9 \pm 2,1$ nM) (figure 36C). En l'absence de VWF, les souris ont une génération de thrombine diminuée ($100 \pm 10,4$ vs $240 \pm 33,1$ nM.min) par rapport aux souris contrôles avec VWF (figure 36B). Le pic de génération de thrombine des souris VWF KO est également diminué par rapport aux souris contrôles ($10,1 \pm 1,5$ vs $18,9 \pm 2,2$ nM) (figure 36C). Après traitement au DSS, les souris VWF KO présentent une diminution de la génération de thrombine par rapport aux souris contrôles traitées au DSS ($142 \pm 23,6$ vs 331 ± 53 nM.min) (figure 36B). Le pic de génération de thrombine des souris VWF KO traitées au DSS est également diminué par rapport aux souris contrôles traitées au DSS ($17,2 \pm 3,2$ vs $39,6 \pm 5,0$ nM) (figure 36C).

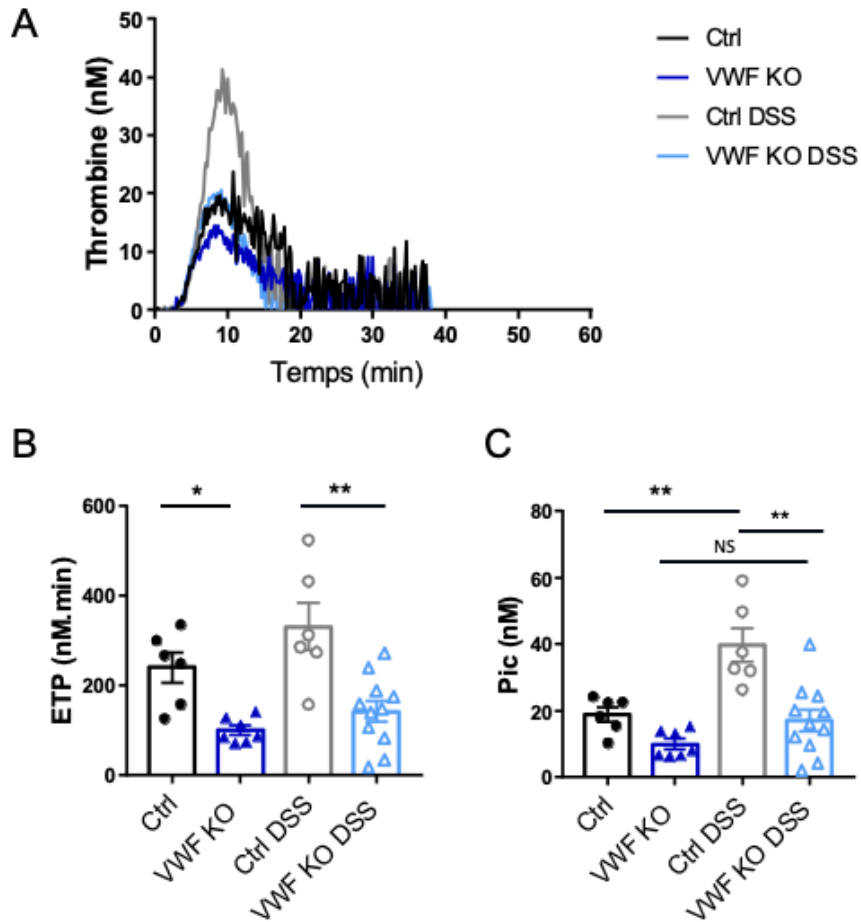


Figure 36 : Génération de thrombine dans le plasma riche en plaquettes de souris contrôles traitées au DSS et des souris KO VWF traitées au DSS

Profil des courbes de génération de thrombine (A). Valeurs des ETP des quatre groupes (B). Valeurs maximales de thrombine générée (pic) (C). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; * $p < 0,05$, $n = 7$ pour les groupes souris contrôles et VWF KO, $n = 6$ pour les souris contrôles traitées au DSS et $n = 11$ pour les souris VWF KO traitées au DSS.

3.4 Dosage plasmatique des complexes ADN-MPO et ADN-Histone chez des souris contrôles traitées au DSS et VWF KO traitées au DSS

Pour les quatre groupes de souris, il n'y a pas de différence dans le dosage des complexes ADN-MPO (*figure 37A*) ni dans le dosage des complexes ADN-Histone (*figure 37B*).

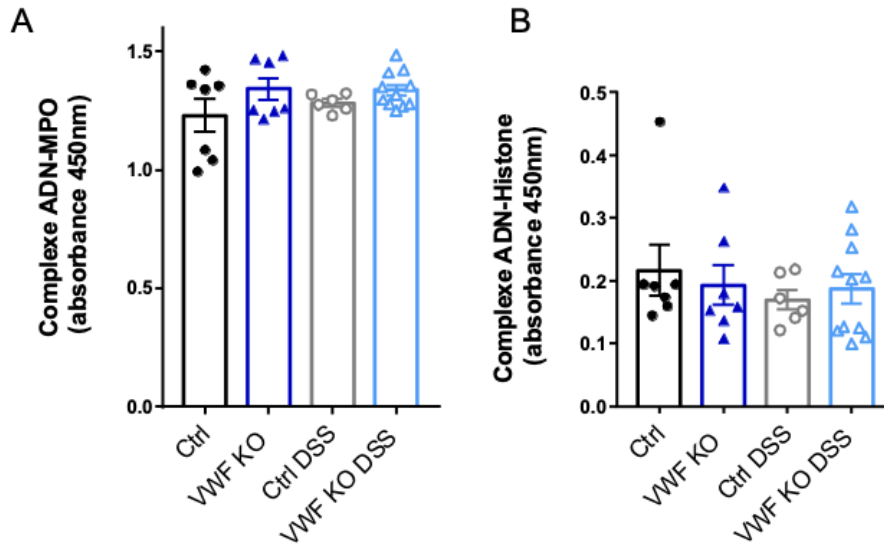


Figure 37 : Dosage des complexes ADN-MPO et ADN-Histone chez des souris contrôles traitées au DSS et des souris VWF KO traitées au DSS

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n = 7$ pour les groupes souris contrôles et VWF KO, $n = 6$ pour les souris contrôles traitées au DSS et $n = 11$ pour les souris VWF KO traitées au DSS.

3.5 Sévérité de la colite chez des souris VWF KO traitées au DSS

Le score histologique a été effectué par un anatomopathologiste en aveugle selon le score de Nancy ⁴² sur des coupes de colon (*figure 38*). Le groupe de souris VWF KO traitées au DSS comporte un pourcentage plus important de souris atteintes sévèrement par la colite comparée aux souris contrôles traitées au DSS (70 % vs 16 %) (*figure 39 et tableau 10*).

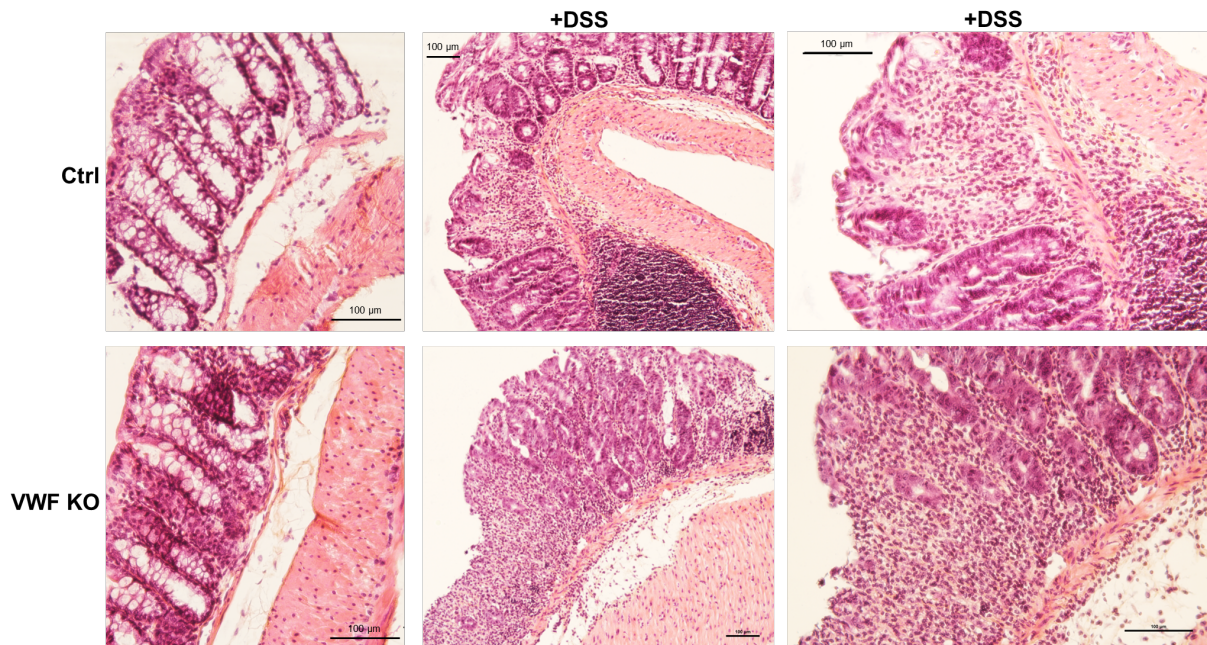


Figure 38 : Coupe de colon chez la souris contrôle traitée au DSS et la souris VWF KO traitée au DSS

Photos prises au microscope objectif x20 et x40, n = 7 pour les groupes souris contrôles et VWF KO, n = 6 pour les souris contrôles traitées au DSS et n = 11 pour les souris VWF KO traitées au DSS.

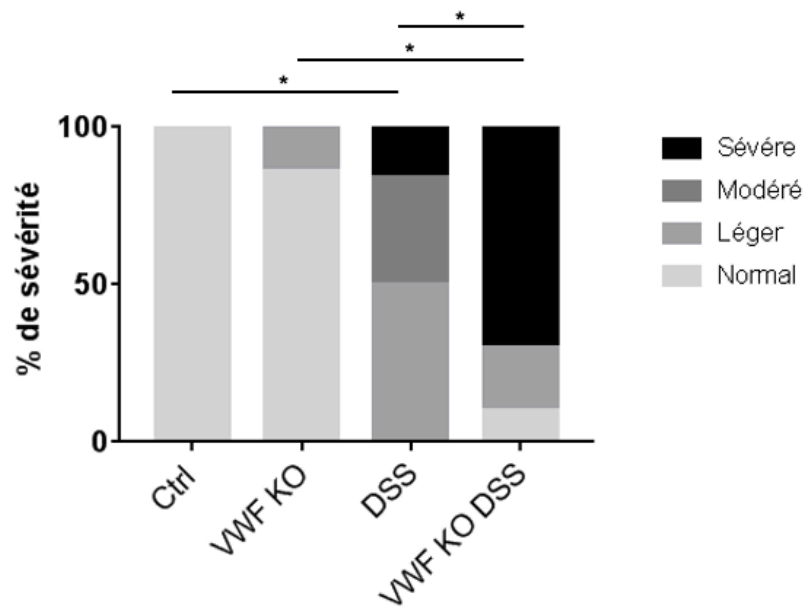


Figure 39 : Pourcentage de sévérité de la colite chez des souris contrôles traitées au DSS et des souris VWF KO traitées au DSS

Les résultats sont exprimés en pourcentage, n = 7 pour les groupes souris contrôles et VWF KO, n = 6 pour les souris contrôles traitées au DSS et n = 11 pour les souris VWF KO traitées au DSS.

	VWF ^{+/+}	VWF ^{+/+} DSS	VWF ^{-/-}	VWF ^{-/-} DSS
Grade selon l'index histologique de Nancy	Normal	Léger et modéré	Normal	Modéré et sévère
Signe d'activité inflammatoire	Non	Oui	Non	Oui
Extension de l'infiltrat inflammatoire	-	Sous-muqueuse	-	Sous-muqueuse et musculuse
Microthrombi	Non	Non	Non	Non
Description	Structure normale	Cryptite, abcès cryptique et destruction des glandes	Structure normale	Cryptite, abcès cryptique et destruction des glandes

Tableau 10 : Analyse faite par l'anatomopathologiste des coupes HES de colon selon l'index histologique de Nancy (lecture en l'aveugle)

PARTIE 5 : DISCUSSION

Ces travaux de thèse ont permis de mesurer une génération de thrombine plus importante chez les patients MICI par rapport à des personnes contrôles et ceci en présence de PRP ou de PPP. Les résultats obtenus ont été confirmés chez des souris traitées au DSS. Ces augmentations, compte tenu des profils procoagulants augmentés et des amas plaquettaires augmentés chez les patients de la cohorte I-BANK et les souris traitées au DSS, nous ont amenés à nous intéresser au facteur VWF qui est connu pour être responsable de la formation d'amas plaquettaires. Le taux plasmatique du facteur VWF est augmenté chez les patients de la cohorte I-BANK et chez les souris traitées au DSS. De plus, 20% des patients de la cohorte I-BANK présentent du facteur VWF actif qui n'est normalement pas mesurable chez les personnes contrôles. En utilisant des souris VWF KO, la génération de thrombine dans le PRP n'est pas augmentée en réponse au traitement par DSS, de même que les amas plaquettaires. En revanche, ces souris ont présenté une aggravation des altérations du tissu colique, ce qui souligne l'importance du maintien d'un équilibre de la coagulation dans les maladies inflammatoires comme les MICI.

Le travail de cette thèse a été d'explorer les acteurs possiblement responsables du phénotype procoagulant chez les patients atteints de MICI.

Nous avons eu la chance de pouvoir accéder à une cohorte de patients MICI pour étudier le phénotype de la coagulation grâce au projet I-BANK du CHRU de Nancy. Nous avons ainsi pu travailler sur du sang frais et être dans une démarche de recherche translationnelle. Pour étudier de manière approfondie les mécanismes responsables de l'augmentation du risque de thrombose chez des patients MICI, nous avons choisi la souris traitée au DSS comme modèle *in vivo*. Ce modèle est connu pour induire une colite mimant la RCH chez l'homme.

L'analyse de notre travail de thèse se portera d'abord sur l'homme.

Rappelons que chez les patients atteints de MICI, le risque de thrombose est augmenté de deux fois par rapport à la population générale^{65,94}. L'étude de Miehsler *et al.*, publiée dans le journal Gut en 2004 a montré qu'au sein des maladies inflammatoires chroniques, le risque thromboembolique est principalement augmenté dans les MICI⁹⁵. Dans cette étude, ils ont inclus 618 patients atteints de MICI, 243 atteints de polyarthrite rhumatoïde et 207 atteints de maladie cœliaque et 707 sujets témoins. Les groupes ont été comparés et appariés en fonction de l'âge et du sexe. En conclusion de cette étude, il apparaît que les patients atteints de MICI présentent un risque accru d'évènements.

Jusqu'à présent, les acteurs jouant un rôle majeur dans cette augmentation du risque de thrombose n'ont pas été bien identifiés, rendant la stratification des patients atteints de MICI ou la mise en place de traitements anticoagulants difficiles ⁷⁷. La coagulation est très affectée par l'inflammation et les patients ont un état hypercoagulable ⁹⁶. Chez les patients MICI de la cohorte IBANK, nous avons observé un compte plaquettaire augmenté comparé à celui d'une population contrôle. Ce phénomène de thrombocytose est bien connu dans ces pathologies ⁹⁷⁻⁹⁹. Une étude avec une cohorte de 217 patients MICI comparés à des sujets sains a montré que l'augmentation du nombre plaquettaire et l'augmentation du fibrinogène étaient des biomarqueurs d'une altération de la coagulation ¹⁰⁰. Les D-Dimères sont également augmentés chez les patients atteints de MICI (actif) ce qui reflète une activation de la coagulation et de la fibrinolyse ¹⁰¹⁻¹⁰³. Au regard des seuils relevés dans la littérature, nous avons mesuré des taux plus élevés de D-dimères chez les patients de la cohorte I-BANK en comparaison des sujets contrôles mais moindres que ceux retrouvés dans la littérature (en moyenne 2 fois plus faibles). Ceci s'explique également par le fait que nous disposons dans la cohorte I-BANK des patients à différents stades de la maladie. Cependant le faible nombre de contrôles ne permet pas d'apporter une conclusion définitive. D'autres tests ELISA (fragment F1+2 de la prothrombine, de l'antithrombine ou fibrinogène par exemple) devront être effectués pour confirmer cette augmentation et il faudra également inclure plus de sujets contrôles.

L'intérêt clinique de la mesure de génération de thrombine est de détecter et suivre les profils hémophiles et thrombotiques. Ce test permet une étude globale de la coagulation (voies endogène et exogène).

Dans la littérature, les données de génération de thrombine ont principalement été obtenues sur du plasma pauvre en plaquettes. Une étude réalisée chez 37 patients atteints de MC, 37 patients atteints de RCH et 74 sujets contrôles a montré que l'ETP était significativement plus élevé chez les patients MICI avec ou sans ajout de thrombomoduline ¹⁰⁴, la thrombomoduline étant utilisée pour évaluer l'implication de la voie anticoagulante de la protéine C. Dans cette étude, le ratio de l'ETP avec et sans thrombomoduline a été utilisé comme indicateur d'hypercoagulabilité. Une autre étude a montré une augmentation de génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes dans une population pédiatrique de patients MICI ¹⁰⁵. Dans cette étude, les auteurs ont également montré une augmentation de différents facteurs de la coagulation comme le TFPI, les fragments F1+2 de la prothrombine, ou encore le fibrinogène. Cette augmentation des fragments F1+2 est également un indicateur d'une génération de

thrombine *in vivo* plus importante et également un marqueur d'activation de la coagulation. Plus récemment, il a été montré que les anti-TNF α induisaient une normalisation de la génération de thrombine chez les patients atteints de MICI. Ainsi, après 22 semaines de traitement avec cette biothérapie, la génération de thrombine revenait à un niveau similaire à celui d'une personne contrôle ¹⁰⁶. Pour valider notre modèle, nous avons commencé notre étude avec des mesures de génération de thrombine.

Nous avons réalisé la génération de thrombine avec et sans plaquettes dans la cohorte I-BANK. Aucune étude de génération de thrombine chez les patients atteints de MICI n'avait été faite en PRP auparavant. Dans les deux expériences, le pic de génération de thrombine était significativement augmenté. Pour l'ETP, il y avait une tendance à l'augmentation en PRP et cette augmentation était significative en PPP. Les résultats en génération de thrombine confirment que les patients MICI ont un profil prothrombotique. Cette expérience de génération de thrombine avec du PPP nous indique un phénotype procoagulant ne dépendant pas uniquement des plaquettes. La mesure de la génération de thrombine nécessite une quantité de plasma importante qui peut être un point limitant dans les études cliniques où les échantillons biologiques sont précieux. Compte tenu de ces résultats, il est important d'identifier les éléments qui sont à l'origine d'une augmentation de la génération de thrombine et du profil procoagulant des patients de la cohorte I-BANK.

Des plaquettes activées ou agrégées pourraient être responsables d'une augmentation de la génération de thrombine ¹⁰⁷. Plusieurs publications ont montré une augmentation du nombre d'agrégats plaquettes-leucocytes en conditions inflammatoires et thrombotiques ^{108,109}. Ceci pourrait résulter d'une activation accrue à la fois des plaquettes et des cellules immunitaires. Nous avons voulu observer si les plaquettes formaient des amas entre elles ¹⁰⁷. Nous avons utilisé des frottis sanguins de patients de la cohorte I-BANK et compté le nombre d'amas de plaquettes.

Nous avons mesuré une augmentation significative du nombre d'amas plaquettaires chez les patients de la cohorte I-BANK en comparaison à des sujets sains.

Le facteur VWF est connu pour permettre aux plaquettes de s'agglutiner et donc de former potentiellement des amas plus importants pouvant agir sur l'hémostase, la génération de thrombine et l'inflammation. Son rôle a été confirmé plus récemment dans la Covid-19 et dans le purpura thrombocytopenie thrombotique ¹¹⁰⁻¹¹². Ainsi l'augmentation de génération de thrombine et l'augmentation des amas plaquettaires peuvent dépendre d'un facteur lié à la fois à la coagulation et aux plaquettes tel que le facteur VWF. Il serait intéressant de faire un marquage en immunofluorescence et une analyse approfondie par microscopie confocale en z-

stack ce qui permettrait d'obtenir des données sur la colocalisation de ces deux acteurs. L'augmentation du facteur VWF dans les MICI a été décrite pour la première fois en 1999 ⁹⁰. Une étude plus récente a montré à la fois une augmentation du facteur VWF chez des patients MICI et une diminution de la métalloprotéinase ADAMTS13 qui clive spécifiquement le facteur VWF ¹¹³. Ces variations pourraient révéler une prédisposition à la thrombose. La seule information connue sur le facteur VWF dans les MICI est l'augmentation de sa concentration plasmatique. Le rôle de facteur VWF n'étant que très peu étudié dans les MICI nous avons décidé de définir ses actions. Pour cela, nous avons pu profiter de l'expérience du Dr. Cécile Denis et du Dr. Peter Lenting de l'unité INSERM 1176 à Paris qui sont des experts du facteur VWF. Leur expertise dans ce domaine nous a permis d'effectuer des dosages du facteur VWF sous sa forme active. En condition physiologique, le facteur VWF circulant est incapable de se lier aux plaquettes. Pour qu'il soit capable de recruter les plaquettes sur le vaisseau lésé il faut qu'il adopte une conformation active où son site de liaison au récepteur plaquettaire, la glycoprotéine GPIIb/IIIa, est alors exposé. En condition pathologique, une activation non contrôlée du facteur VWF entraîne une formation d'agrégats VWF-plaquettes associés à une thrombocytopénie et à des complications thrombotiques. Un nano-anticorps dérivé du lama a été mis au point pour reconnaître la forme active du facteur VWF dans un test d'immuno-absorbance ¹¹⁴. Des taux augmentés de facteur VWF actif ont été démontrés dans plusieurs maladies : maladie de von Willebrand de type 2B, purpura thrombocytopenique thrombotique ou encore drépanocytose ^{115,116}. Dans notre cohorte de patients I-BANK, environ 20% présentent du facteur VWF actif. Cette observation est nouvelle et n'a jamais été décrite dans la littérature. Le facteur VWF actif a été décrit dans plusieurs maladies (*tableau 11*) mais c'est la première fois qu'il est quantifié dans la pathologie des MICI. Ce résultat appuie encore un peu plus la présence d'un profil prothrombotique dans les MICI.

Maladies	Facteur VWF actif (augmentation)	Référence
Maladie de von Willebrand de type 2B	2 à 15 fois	Hulstein <i>et al.</i> 2005
Le purpura thrombocytopénique thrombotique	2 à 4 fois chez les patients avec syndrome acquis et 4 à 12 fois pour la forme congénital	Hulstein <i>et al.</i> 2005
Syndrome de HELLP	3 fois	Hulstein <i>et al.</i> 2006
Syndrome des antiphospholipides	2 fois	Hulstein <i>et al.</i> 2007
Paludisme	1,5 à 7 fois	De Mast <i>et al.</i> 2007
Dengue	2 à 9 fois	Djamiatun <i>et al.</i> 2012
Syndrome de réponse inflammatoire systémique	1,5 fois chez les patients décédés	Hyseni <i>et al.</i> 2014
Diabète	1,5 à 2,5 fois	Chen <i>et al.</i> 2013
Premier infarctus du myocarde avec élévation du segment ST	1,5 à 2 fois	Rutten <i>et al.</i> 2015
Drépanocytose	1 à 5 fois	Chen <i>et al.</i> 2021

Tableau 11 : Liste de maladies avec présence de facteur VWF actif

HELLP : hémolyse, élévation des enzymes hépatiques et faible taux de plaquettes.

Pour conclure cette première partie, les patients de la cohorte I-BANK présentent une génération de thrombine augmentée, une augmentation du taux plasmatique de facteur VWF antigénique et 20% de la cohorte présentent du facteur VWF sous sa forme active.

Dans cette deuxième partie de la discussion, nous nous intéressons aux résultats obtenus chez la souris. Grâce au modèle murin de colite, nous avons pu explorer et caractérisation le phénotype procoagulant en ayant un modèle couramment utilisé, robuste et induisant des lésions mimant la RCH. Les échantillons humains étant limités et précieux, la souris est une bonne alternative pour étendre notre recherche et mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'augmentation du risque de thrombose.

Les résultats que nous avons mesurés en génération de thrombine sur le plasma riche en plaquettes chez les patients de la cohorte I-BANK ont également été retrouvés chez les souris traitées au DSS. Cependant, chez les souris traitées au DSS, cette différence de génération de

thrombine n'était plus présente en plasma pauvre en plaquettes. Le modèle au DSS permet donc d'étudier plus spécifiquement l'effet des plaquettes sur le phénotype procoagulant lié aux MICI, quand beaucoup d'autres facteurs peuvent également influencer ce phénotype chez les patients. Nous avons voulu aller plus loin dans la caractérisation du phénotype des plaquettes dans le modèle de souris traitées au DSS.

Une étude a montré la présence d'une activation des plaquettes de souris traitées au DSS par rapport à des souris contrôles ⁹⁹. Au cours du temps, entre J0 et J6, il y a une augmentation du nombre de plaquettes JON/A positives (épitope de l'activation de l'intégrine GPIIb/IIIa) et de la P-sélectine, ce qui reflète un état d'activation des plaquettes au cours du traitement au DSS. Cette étude a également montré une augmentation du nombre d'agrégats plaquettes-leucocytes chez les souris traitées au DSS. Selon cette étude, l'activation plaquettaire se distingue par une population de plaquettes matures et immatures. La présence de plaquettes immatures dans le sang reflète chez les patients atteints de MICI une thrombopoïèse accélérée ¹¹⁷.

Nous avons utilisé la cytométrie en flux pour mieux caractériser l'activation plaquettaire avec comme marqueur :

- JON/A, qui intervient dans l'adhésion et l'agrégation des plaquettes.
- P-selectine, qui est exprimée à la surface des plaquettes lorsque celles-ci sont activées.
- Annexine V pour mesurer l'exposition de phosphatidylsérine.

Nous n'avons pas observé de différence d'activation basale des plaquettes en sang total entre les souris contrôles et les souris traitées au DSS. Pour valider ce résultat et conforter ou non la littérature existante il faudrait recommencer l'expérience.

Un autre sous-type de plaquettes peut être responsable d'une augmentation de la génération de thrombine, les plaquettes procoagulantes ¹¹⁸. Il a été montré qu'une population atteinte de coronaropathies avait, après activation, plus de plaquettes procoagulantes et que celles-ci augmentaient avec le risque de thrombose ¹¹⁹. Ces plaquettes ont plus de phospholipides procoagulants, permettant un meilleur assemblage des complexes de facteurs de la coagulation. Elles se localisent aux sites d'exposition du collagène et la génération de ces plaquettes procoagulantes est augmentée par l'activation d'une combinaison de thrombine et de collagène. Dans cette étude de patients atteints de coronaropathies, les auteurs ont utilisé la GSAO (acide 4-(N-((S-glutathionyl) acétyl) amino) benzoïque) et la P-sélectine après activation par différents agonistes (ADP, collagène de type 1, thrombine et combinaison thrombine plus collagène). L'annexine V serait moins spécifique que la GSAO pour identifier cette population. Ils ont observé une augmentation significative du nombre de plaquettes procoagulantes après activation par la thrombine et la combinaison thrombine plus collagène. Nous avons utilisé ce

même protocole sur du sang de souris traitées au DSS pour mesurer la proportion de plaquettes procoagulantes. Pour les agonistes, nous avons utilisé du collagène, du TRAP-6 ou la combinaison des deux. Nous n'avons pas trouvé d'augmentation du nombre de plaquettes procoagulantes chez les souris traitées au DSS. Mais il n'y avait pas non plus de différence avec la P-sélectine exprimée par les plaquettes activées. Cette étude de plaquettes procoagulantes a été faite chez l'homme et pour nos propres travaux chez la souris. Il conviendra d'approfondir les protocoles. Il serait intéressant de reproduire ce protocole sur la cohorte de patients I-BANK. Ceci n'a pas été faisable durant nos travaux car nous n'avons à notre disposition qu'une certaine quantité de sang frais. Certains de nos résultats comme la génération de thrombine corroborent la littérature. Il serait donc intéressant d'utiliser le sang destiné à la génération de thrombine pour cette expérience et pouvoir étudier des plaquettes en cytométrie chez l'homme avec les mêmes anticorps et la sonde GSAO.

Malgré l'absence de différence d'activation basale, nous avons recherché la présence d'amas plaquettaires comme pour la cohorte I-BANK. Nous avons observé une augmentation significative du nombre d'amas plaquettaires chez les souris traitées au DSS.

Ces dernières années, un nouveau concept alliant la coagulation et la réponse immunitaire a vu le jour : l'immunothrombose. En condition physiologique, l'immunothrombose est protectrice en formant des microthrombi pour éviter la dissémination des agents pathogènes dans l'organisme, mais dès lors qu'elle est dérégulée par une coagulation accrue et un système immunitaire dérégulé, elle va intervenir dans la formation de thrombi pathologiques. Cette immunothrombose a été rapportée dans diverses maladies tels que la Covid-19 ¹²⁰, la thromboembolie veineuse ¹²¹ ou encore le sepsis ²⁷. L'un des acteurs majeurs de l'immunothrombose est la formation de NETs permettant d'amplifier la formation de microthrombi et induire un processus pathologique : la thrombose ^{27,122}. Sur les coupes de colon des souris traitées au DSS, l'anatomopathologiste n'a cependant pas décelé de microthrombi. Chez l'humain la présence ou non de microthrombi dans le tissu colique est également débattue ^{42,77}. Il faudra s'aider de l'imagerie (scanner, IRM) et de pièces chirurgicales mésentériques pour pouvoir prouver la présence de microthrombi.

Les complexes ADN-MPO circulants sont également augmentés chez des patients atteints de MICI ¹²³. L'infiltrat de neutrophiles au niveau de la muqueuse colique est également plus important et en faveur d'une immunothrombose augmentée. Il y avait également une augmentation de la MPO et des histones chez la souris traitée au DSS montrant une augmentation du risque thrombotique dans les MICI. Dans cette même étude, chez des souris

traitées au DSS un traitement avec un anti-neutrophile visant à inhiber les NETs permettait d'atténuer la gravité de la colite.

Une autre étude a montré une forte augmentation de granulocytes et de NETs à la surface de la muqueuse dans la RCH et en particulier dans les zones d'érosions et d'ulcérations ¹²⁴. Les auteurs ont induit des blessures coliques aux souris traitées au DSS lors de l'endoscopie entraînant un saignement et activant l'hémostase. Le caillot était très infiltré par des neutrophiles. Une quantité importante de MPO et d'histones a été retrouvée dans les caillots. Chez des souris invalidées pour la peptidyl-arginine déiminase de type 4 (PAD4), la cicatrisation et le remodelage de la muqueuse colique étaient altérés. La molécule PAD4 permet la décondensation de la chromatine au cours de la formation des NETs ^{125,126}. Ainsi les neutrophiles, via PAD4, jouent un rôle dans le remodelage des caillots sanguins et des saignements rectaux et seraient protecteurs dans la colite aigüe alors qu'une immunothrombose insuffisante serait associée à des saignements rectaux. Ces résultats montrent de manière intéressante que l'immunothrombose a un effet protecteur en limitant les saignements. Contrôler l'immunothrombose pour qu'elle ne soit pas pathologique pourrait jouer un rôle thérapeutique.

Ainsi, nous avons souhaité caractériser la présence d'une immunothrombose dans le modèle de souris traitées au DSS. Nous avons dosé les NETs via les complexes ADN-MPO et ADN-Histone. Cependant, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les souris traitées au DSS et les souris contrôles des deux groupes. Au vu des résultats obtenus, nous nous sommes intéressés au facteur VWF qui est un acteur de l'immunothrombose. Pour la suite du projet, il serait intéressant de doser les histones et la MPO chez les patients de la cohorte I-BANK. Le taux de facteur VWF plasmatique circulant est augmenté chez les souris traitées au DSS. Malheureusement, nous n'avons pas pu doser le taux de facteur VWF actif chez nos souris traitées au DSS car la technique n'est pas mise au point chez la souris pour valider les résultats observés chez les patients de la cohorte I-BANK.

La seconde partie de notre étude chez la souris s'est portée sur le facteur VWF en utilisant des souris déficientes pour ce facteur et traitées au DSS. Les souris nous ont été fournies par l'équipe INSERM du Dr. Cécile Denis à Paris. Ces souris sont également déficientes en FVIII. Une déficience en FVIII entraîne une génération de thrombine diminuée. Cette génération de thrombine diminuée est présente chez des patients atteints d'hémophilie A ou atteints de la maladie de Willebrand ^{127,128}. Il est connu que chez des patients atteints de la maladie de Willebrand de type 2 et 3 la génération de thrombine est diminuée par rapport à celle des sujets

contrôles ¹²⁹. Il n'y a pas d'article dans la littérature utilisant des souris VWF KO pour étudier la génération de thrombine en présence de plaquettes ou les effets d'un traitement par DSS. Nous avons pu montrer que les souris VWF KO avaient une génération de thrombine diminuée par rapport à celle des souris contrôles. De plus, malgré l'inflammation provoquée par le traitement au DSS, la génération de thrombine chez les souris VWF KO reste à un niveau basal contrairement à celle des souris contrôles traitées au DSS où elle était augmentée. Il n'y a pas d'augmentation du nombre d'amas plaquettaires chez les souris VWF KO traitées au DSS par rapport au groupe de souris contrôles traitées au DSS. Il est ainsi possible de conclure que le facteur VWF contribue au phénotype procoagulant présent chez le modèle de souris MICI. Le facteur VWF module l'angiogenèse et favorise la cicatrisation des plaies ^{130,131}. Un défaut en facteur VWF chez la souris entraîne un retard de cicatrisation accompagné d'une diminution de l'angiogenèse ¹³¹. Nous avons observé une colite plus importante chez nos souris VWF KO traitées au DSS en comparaison de celle des souris contrôles traitées au DSS sans que l'état général des souris ne soit affecté. Malgré la protection apportée par une diminution du facteur VWF au niveau du phénotype procoagulant, son absence augmenterait la gravité des lésions intestinales comme le montrent nos images histologiques. Ceci rejoint également l'article sur le rôle de PAD4 dans la colite ¹²⁴ où son absence augmente les saignements rectaux et aggrave la colite du fait d'une coagulation (immunothrombose) limitée. Il faudrait faire des études pharmacologiques avec un anti-facteur VWF pour mesurer les effets dose/réponse et pouvoir définir un seuil où la diminution du facteur VWF devient délétère.

Pour conclure, nous n'avons pas retrouvé d'augmentation du complexe ADN-MPO chez des souris traitées au DSS contrairement à ce qui est publié dans la littérature. Nous avons trouvé une génération de thrombine augmentée chez les souris traitées au DSS. Les souris traitées au DSS présentent également une augmentation du nombre d'amas plaquettaires. Ces résultats confortent ceux trouvés chez l'homme. Les souris VWF KO traitées au DSS présentent une génération de thrombine diminuée par rapport aux souris contrôles traitées au DSS. La gravité de la colite est augmentée chez les souris VWF KO traitées au DSS. Ces deux résultats montrent l'importance du facteur VWF dans la coagulation et dans le maintien de l'hémostase.

Conclusion et perspectives

Nous avons pu identifier les plaquettes et le facteur VWF comme des acteurs centraux du phénotype procoagulant présent dans les MICI. Il serait nécessaire, pour aller plus loin, d'évaluer l'intérêt d'une inhibition partielle du facteur VWF dans un premier temps chez la souris traitée au DSS. Il serait également utile de confronter le modèle DSS à celui d'une colite induite par le TNBS et pouvoir ainsi comparer et interpréter ces résultats avec ceux obtenus chez l'homme. En dépit du fait que nous n'avons pas mis en évidence de phénotype immunothrombotique dans le modèle de souris traitées au DSS, il serait important de quantifier les NETs chez les patients atteints de MICI. Par la suite, ces résultats aideront à la mise évidence de marqueurs prédictifs du risque thrombotique permettant d'adapter les traitements ciblant les MICI, ou d'introduire des traitements anticoagulants. Dans l'avenir, il serait intéressant d'utiliser des souris contrôles traitées au DSS et recevant des doses croissantes d'un agent anti-VWF. Un consensus international a été adopté en 2021 sur la prévention des événements thrombotiques veineux et artériels chez les patients atteints de MICI ⁷⁷.

De nombreux patients ne répondent pas aux thérapies actuellement disponibles sur le marché ¹³². De nombreuses molécules sont actuellement en phase clinique 1-2 ou 3 ¹³³. Ces études sont répertoriées sur le site Clinicaltrials et parmi les nouvelles molécules testées se trouvent des anti-interleukines ciblant l'IL-6, -7 et -36 mais également des molécules stimulant la production d'interleukines comme l'IL-2 et l'IL-10. Il y a également des anti-chimiokines ciblant CD3, CD40 ou encore CD162 ¹³³. Toutes ces molécules sont des modulateurs de l'inflammation et du système immunitaire. Il est intéressant de faire le lien entre ces immunothérapies et le risque de thrombose car actuellement certains traitements des MICI pourraient entraîner une augmentation du risque de thrombose ^{48,73}.

PARTIE 6 : ANNEXE

L'article de mon travail de thèse en cours de rédaction :

The role of platelets and von Willebrand factor in the procoagulant phenotype of IBD

Célia Schellenberg^{1*}, Jérémy Lagrange^{1,2*}, Muhammad Usman Ahmed¹, Philippe Campoli^{2,3}, Huguette Louis¹, Bénédicte Caron^{2,4}, François Plénat⁵, Julien Perrin^{1,2}, Peter J Lenting⁶, Véronique Regnault¹, Patrick Lacolley^{1#}, Cécile V Denis^{6#}, Laurent Peyrin-Biroulet^{2,4,7#}

1 Université de Lorraine, INSERM, DCAC, Nancy, France.

2 CHRU Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

3 CHRU, Anatomie et cytologie pathologiques, Nancy, France.

4 Department of Gastroenterology, CHRU Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

5 Université de Lorraine, Nancy, France.

6 HITH, UMR_S1176, INSERM, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France.

7 Université de Lorraine, INSERM, NGERE, Nancy, France.

*, # : equal contribution

Correspondance :

Jérémy Lagrange ; jeremy.lagrange@inserm.fr, INSERM 1116 DCAC 9 avenue de la forêt de Haye 54 505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Abstract: 245 words

Word count: 3500 words

Key words: von Willebrand factor, inflammatory bowel diseases, blood platelets, thrombosis.

Conflicts of interest: The authors state that they have no conflict of interest.

ABSTRACT

Objective

Even though the risk for thrombosis is well documented in inflammatory bowel disease (IBD) patients, the pathogenesis of thrombosis seems to be different from the general population. Deciphering the actors responsible for the increased risk of thrombosis in IBD would help to improve management of this frequent complication.

Design

We studied the interplay existing between platelets and coagulation using thrombin generation assays in 95 IBD patients and an experimental model of colitis in wild type and von Willebrand factor (VWF)-deficient mice.

Results

We found a platelet-dependent increase in thrombin generation in IBD patients and in our mouse model of colitis. Agglutinated platelets were present in the blood of patients and mice. Besides this platelet phenotype, we observed not only a significant increase in total VWF antigen, but we were able to detect the presence of active VWF (VWF in its platelet-binding conformation) in the plasma of nearly one-fifth of all IBD patients while active VWF is usually below detectable levels in healthy controls. This led us to further explore experimental colitis in VWF-deficient mice and we observed that these mice were protected against the procoagulant state triggered by the colitis but strikingly they were also experiencing a worsening of colitis severity.

Conclusion

Platelets and VWF (and its active form) appear to be central players in the pro-coagulant phenotype in IBD. We highlighted the dual role of VWF in hemostasis and tissue healing. This opens new therapeutic avenues for a life-threatening complication in IBD patients.

KEY MESSAGES

- **What is already known on this topic**
- IBD is an independent risk factor for thrombotic events.
- The pathogenesis of thrombosis in IBD patients appears to be distinct from other conditions where thrombotic risk is increased.
- **What this study adds**
- We reported an increased thrombin generation monitored in platelet-rich plasma, increased platelet agglutination and the presence of active VWF in IBD patients.
- In the dextran sulfate sodium mouse model of colitis thrombin generation in platelet rich plasma and platelet agglutination are also present.
- VWF-deficient mice are protected against the procoagulant phenotype induced by colitis but are experiencing aggravated colitis highlighting the active role of hemostasis proteins in limiting inflammation but doing at the risk of thrombotic complication.
- **How this study might affect research, practice or policy**
- IBD physicians should be aware of the potential dual role of hemostatic proteins such as VWF and that targeting them to prevent thrombosis may lead to a worsening of the clinical picture.
- The use of platelet rich plasma thrombin generation and measurement of active VWF in plasma from IBD patients may represent new markers to stratified patients at risk for thrombosis

BACKGROUND

Inflammatory bowel disease (IBD), which includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is an independent risk factor for first and recurrent thrombotic events[1]. Meta-analyses in large populations have revealed that in IBD patients the risk of venous thromboembolism (VTE) is increased more than two-fold as compared to the general population[2,3]. Major arterial thrombotic events such as myocardial infarction, splanchnic ischemia and stroke are also increased in IBD patients[4].

The increased risk for thrombosis in IBD patients is well documented and several changes in hemostasis processes have been identified: (i) increased platelet count, (ii) increased markers of *in vivo* coagulation activation and increased procoagulant proteins such as von Willebrand factor (VWF), and (iii) increased plasma fibrinogen and denser fibrin clot[5].

So, despite the presence of intestinal bleedings, the clinical picture in IBD patients remains in favor of a clear imbalance towards a procoagulant phenotype. However, pathogenesis of thrombosis in IBD patients seems to be different from other conditions where thrombosis may occur. For example, the *in vitro* clotting assays usually performed to diagnose a thrombotic situation, fail to be efficient in IBD patients since clotting times can be unchanged or even prolonged in these patients[5].

Until now, anticoagulant treatment in IBD patients is given during hospitalization periods and consists of low molecular weight heparin or fondaparinux[6]. However, the risks of thrombosis and/or of bleeding are still increased during a flare for non-hospitalized patients[7]. Thus, a better understanding of the relationship between inflammatory and haemostatic pathways in IBD would help to limit the risk and lead to better management of patients.

We studied, for the first time in IBD the interplay existing between platelets and coagulation with the use of thrombin generation assays in IBD patients and dextran sulfate sodium (DSS) mouse model of colitis using a translational approach. As we identified platelets and VWF to be closely related to the procoagulant profile in IBD we then explored these mechanisms in VWF-deficient mice. In these mice we found protection against the procoagulant state triggered by the colitis with, in parallel, a worsening of the colitis. These results highlighted the ability of VWF to participate both in procoagulant phenotype in IBD and tissue healing.

METHODS

Human samples

This study used 55 healthy volunteers and 95 IBD patients included in the I-BANK cohort (which aims to identify prognostic and predictive circulating biomarkers in inflammatory bowel disease, NCT03809728) was obtained by venipuncture via a 21-gauge needle and collected in 0.129 mol/L sodium citrate (9:1 vol/vol). Patients included in the I-BANK study were adult patients with a diagnosis of Crohn's disease (CD) or ulcerative colitis (UC). Disease activity was assessed with the Harvey-Bradshaw Index (HBI) for patients with CD, and the partial Mayo score (PMS) for patients with UC. HBI < 5 and PMS ≤ 2 were defined as clinical remission for CD and UC patients respectively. Patients' distribution among the different experiments is summarized in supplementary figure 1. Complete blood counts were determined with an automatic cell counter (Micros 60 ABX model, Montpellier, France). Platelet-rich plasma (PRP) was prepared within 2 h following blood sampling with a first centrifugation at 190 g for 10 min at 20°C. The supernatant was removed, and the platelet count was adjusted to $200 \times 10^9/L$ with platelet poor plasma (PPP) prepared with a 10 min centrifugation at 1,750 g at 20°C. Platelet-free plasma (PFP) was prepared by centrifuging PPP at 13,000 g for 30 min at 4°C. The remaining PFP was stored at -80°C until use.

Wild-type and VWF-deficient mice

Eight- to 10-week-old C57BL/6N male (n=36) mice were purchased from Charles River. Male VWF-deficient (VWF KO) mice (n=18) or their control littermate (n=13), also on a C57BL/6 background, were used for this study[8]. Housing and experiments were conducted in accordance with the French regulations and the experimental guidelines of the European Community (Directive 2010/63/EU). Animals were housed under standard conditions and given free access to standard rodent chow and water. The protocols were approved by the local Animal Ethics Committee of the University of Lorraine, France (#9411-2017032718404787 v4).

Induction of colitis

Mice were treated with dextran sulfate sodium (DSS) to induce colitis by administration of 3% DSS, (molecular weight 36,000–50,000, MP Biomedicals) dissolved in drinking water for five days. DSS solution was replaced thereafter by normal drinking water for another three days as previously described[9]. Mice were euthanized on the 8th day via isoflurane anesthesia followed by cervical dislocation.

Assessment of Disease Activity Index in mice

Mice were weighed on a daily basis and evaluated for clinical symptoms. The Disease Activity Index (DAI) was determined on a scale from 0 to 4 and calculated as the mean of three individual subscores (body weight loss, stool consistency, and blood in the stool) as previously described[10].

Blood sampling, PRP and PFP preparation in mice

Mice were anesthetized with isoflurane inhalation (1.5% in 1L/min oxygen). Whole blood was collected *via* heart right ventricle puncture following opening of the thoracic cage diaphragm and mixed with 10% citrate (109 mM) for calibrated automated thrombography (CAT) experiments. PRP was prepared by 2 successive centrifugations 190 *g* for 4 min and 1750 *g* for 1 min at 20°C. The platelet count was adjusted to $200 \times 10^9/L$ with PPP prepared with a 10 min centrifugation at 1,750 *g* at 20°C and then supernatants were centrifuged at 13,000 *g* for 30 min to remove all platelets and cell fragments. PFP was frozen and stored at -80°C until use.

Thrombin generation assay in human and mice

Calibrated automated thrombography (CAT) was performed at 37°C in a microtiter plate fluorometer (Fluoroskan Ascent, ThermoLabsystems) using a dedicated software program (Thrombinoscope BV) as reported previously for human[11] and mice[12]. Thrombin generation was triggered by recalcification in the presence of recombinant human TF (0.5 pM) (Dade Behring). Round-bottom 96-well Greiner blue plates were used for PRP and PFP.

Measurement of total VWF in human and mice and active VWF in human

Total VWF was measured with the asserachrom VWF kit (Diagnostica Stago).

Active VWF was detected by ELISA, using the llama nanobody AU/VWFA-11 (which detects a gain-of-function conformation of the A1 domain) as the capture antibody and polyclonal VWF antibody to detect bound VWF. The slope of VWF captured to VWF added for test plasmas was divided by the slope for pooled normal plasma, and this ratio was designated the VWF activation factor. Total active VWF was determined by multiplying VWF antigen by the VWF activation factor[13].

Platelets analysis in whole blood via flow cytometry in mice

Blood was collected as previously described but with addition of PPACK (80 μ M Sigma Aldrich) and diluted in Tyrode's buffer (dilution 1:20) (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.3 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 5 mM HEPES, 12 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, pH 7.4). To 20 μ l of diluted blood, 5 μ l of GPIIb/IIIa-FITC antibody (Emfret, #M040) were added to gate only platelets, 5 μ l of CD62P-B421V antibody (BD Horizon™ 564289), 5 μ l of Annexin V-PE CF594 antibody (BD Horizon™ 563544), 5 μ l of JON/A-PE (Emfret, #M023-2) or 5 μ l CD41/61-PE (Emfret, Leo. F2, #M025-2). Tyrode buffer was added to a final volume of 100 μ l, and the mixture was incubated for 30 min in the dark at 37°C. The reaction was stopped with 300 μ l of Tyrode buffer and the samples were analyzed with the Celesta cytometer (Becton Dickinson). Flow cytometry data were analyzed with the Kaluza software.

Platelet agglutination analysis in human and mice

Blood smears were made using 5 μ l of blood on a polysin™ Adhesion Microscope Slides. The May Grunwald-Giemsa (MGG) staining was performed by the hematology department at the CHRU Nancy hospital. For each smear platelet, agglutinates were counted in 10 independent fields under a Nikon eclipse Ti2 microscope using the 60X objective. Agglutinates were divided in 2 groups: 2 to 5 platelet agglutination, and more than 5.

Histological Assessment and Scoring in mice

Colon samples were thoroughly washed, prepared using the Swiss-rolling technique[14] fixed in 10% neutral phosphate buffered formalin solution for 24 h and embedded in paraffin. Colitis was histologically assessed on 5 μ m thick sections

stained with hematoxylin-eosin-saffron. The histological colitis score was calculated by expert pathologists unaware of the animal experimental groups, as previously described[15,16]. Briefly, disease scoring was based on six histological features: acute inflammatory cell infiltrate (polymorphonuclear cells in the lamina propria), crypt abscesses, mucin depletion, surface epithelial integrity, chronic inflammatory cell infiltrate (round cells in the lamina propria), and crypt architectural irregularities. Each feature was graded on a 4-point scale corresponding to none, mild, moderate, or severe.

Lipocalin Assay in mice

The colon was lysed using the cell lysis kit (Bio rad). Lipocalin-2 (LCN-2) was determined in lysed tissue (dilution 1:100) using an ELISA kit (Duoset Lcn-2 ELISA Kit, R&D system).

Statistical analysis

Two-group comparisons were performed using Mann-Whitney U-test for non-parametric data or t-test for parametric data. ANOVA with Tukey's post-hoc test for parametric data or Kruskal Wallis with Dunn's correction for non-parametric data were used to compare more than two groups. Statistical significance was considered as p values < 0.05. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA).

RESULTS

Increased platelet-dependent thrombin generation in IBD patients

We found an increased thrombin generation monitored in platelet-rich plasma from 95 patients with IBD compared to healthy subjects. Characteristics of patients included in the I-BANK cohort are shown in Table 1. In this cohort 71 CD and 24 UC patients were recruited; 55% were males and the mean age was 42 years old. Thrombin generation was higher and faster in patients with IBD as seen with increased peak of thrombin and decreased time to peak (Figure 1A). This increase was observed regardless of the type of IBD disease (CD or UC) or disease activity. Analysis of blood smears revealed the presence of platelet agglutinates in IBD patients compared to healthy controls (Figure 1B-C). We presented here for the first time an increased thrombin generation in presence of platelets in IBD patients

Elevated VWF antigen and presence of active VWF in patients with IBD

Since platelet capacity to agglutinate may depend on hemostatic proteins such as VWF[17,18], we first measured plasma concentration of VWF antigen. We found increased VWF in IBD patients compared to healthy controls (Figure 2A). Interestingly, a positive correlation between VWF concentration and disease activity score of CD patients was uncovered (Figure 2B).

Beyond the mere increase in VWF antigen, we evidenced the presence of the active platelet-binding form of VWF in 20% of patients (Figure 2C). This active form is normally undetectable in healthy controls (limit of detection, 0.09 µg.ml). What was particularly interesting is that patients displaying active VWF have increased peak of thrombin generation and faster time to peak compared to patients without active VWF (Figure 2D). Altogether, by showing a thrombin generation in the presence of platelets correlated with the presence of active VWF, our data identify a new player potentially contributing to the procoagulant phenotype in IBD.

Table 1. Patient characteristics.

	Crohn's disease	Ulcerative colitis
n (%)	71 (100)	24 (100)
Male, n	42 (59)	10 (42)
Age (years) ± SD	40 ± 11	45 ± 14
Surgery for IBD	37 (52)	5 (21)
Cigarette smoking	20 (28)	3 (12.5)
Treatments		
Anti-TNFα	26 (37)	3 (13.5)
Anti-IL12/23	21 (30)	3 (12.5)
Anti-α₄β₇	3 (4.2)	3 (12.5)
Anti-JAK	1 (1.4)	4 (17)
Steroids	8 (11.3)	14 (58)
No treatment	13 (18)	3 (12.5)

DSS-treated mice exhibit IBD patients procoagulant phenotype

In order to better understand the mechanisms at play in this increased thrombin generation in PRP we next used an experimental mouse model of colitis induced by DSS. As in IBD patients, thrombin generation in PRP in DSS-treated mice was increased indicating the presence of a procoagulant phenotype (Figure 3A). Similar to IBD patients, DSS treated mice also display increased total VWF in plasma (Figure 3B). Since platelets appear to play a central role in the procoagulant phenotype present in IBD, we performed flow cytometry analysis to measure their basal activation in whole blood from DSS-treated mice (Figure 3C). Platelet population was gated using glycoprotein (GP) I β and activation status was determined with P-Selectin, Annexin V, CD41 and JON/A. No variations were visible between the groups (Figure 3C). However, platelet ability to agglutinate was increased in DSS-treated mice with large agglutinates of more than 5 platelets increased almost 4 times in DSS-treated mice compared to control mice (Figure 3D). These results suggest that even though they are not activated, platelets can nevertheless contribute to an increased procoagulant potential in IBD.

Decreased thrombin generation and platelet agglutination in DSS-treated VWF KO mice

In order to decipher the importance of VWF in these processes, we used VWF KO mice treated with DSS. Mice KO for VWF and treated with DSS showed lower platelet agglutinates compared to control mice treated with DSS: small agglutinates of 2-5 platelets were similar to control DSS treated mice while agglutinates of more than 5 platelets were significantly decreased in VWF KO DSS treated mice (Figure 4A-B). To investigate the co-influence of VWF and platelets on the procoagulant phenotype triggered by colitis, we assessed thrombin generation in PRP. At baseline, VWF KO mice showed significantly less thrombin generated (decreased endogenous thrombin potential (ETP) with a strong tendency towards a peak decrease (Figure 4C). Following DSS treatment, thrombin generation remained lower in the absence of VWF compared to DSS-treated control mice but the most striking observation was that in contrast to control mice, DSS treatment did not induce any increase in thrombin generation in VWF KO mice compared to the basal situation ($p > 0.99$ for the ETP and $p > 0.74$ for the peak). These results indicated that VWF was crucial in the platelet-dependent increased thrombin generation due to colitis.

Lack of VWF aggravates colitis

Since IBD is not only characterized by an increased risk of thrombosis but also intestinal bleedings and because VWF is one of the central molecules in hemostasis regulation and is also important for tissue healing, we explored the colitis phenotype of VWF KO mice treated with DSS. Weight loss and disease activity index (DAI) were not different between controls and VWF KO mice following DSS treatment (Figure 5A). We measured lipocalin-2 in mice colonic tissue as marker for intestinal inflammation and found a strong tendency of increased inflammation in VWF KO mice (Figure 5B). In addition, histological scores revealed an elevation of the colitis severity in VWF KO mice compared to control mice (Figure 5C-D). The histological observation confirmed that VWF KO mice treated with DSS display a worsened colitis, highlighting the importance of VWF in limiting tissue damage.

DISCUSSION

Compared to the general population the risk of thrombosis in IBD patients is more than two-fold increased[2,3]. However, the mechanisms underlying such an increased risk are not well identified, especially since the classical molecular players of hemostasis are differently regulated due to the chronic inflammation present in the context of IBD. What is well documented is an increased platelet count in IBD patients, corresponding to reactive thrombocytosis[19]. Using a DSS mouse model, we have been able to show that this feature is also present in mice (Supplementary Table 1).

Since platelets, through the expression of procoagulant phospholipids, support thrombin generation and subsequent formation of a fibrin clot, the interplay between platelet activation and fibrin clot formation is of central importance in gaining a better understanding of the risk of thrombosis. It is for this reason that we studied thrombin generation in PRP from IBD patients or colitis mouse models. This allowed us to highlight the central importance of platelets in the increased procoagulant phenotype occurring in IBD. Of note, contrary to others, we did not find in the DSS-treated mouse model, basal activation of platelets assessed by flow cytometry[20]. This divergence compared to others can be related to the DSS model itself that is very sensitive to mouse housekeeping. Indeed despite identical DSS protocols, we noticed that our mice were less prone to very severe colitis (Supplementary Figure 2B).

When performing thrombin generation assays in PRP, thrombin is the main activator of platelets. Interestingly in CD, the platelet thrombin receptors, protease activated receptors 1 and 4 (PAR-1; PAR-4), were found to increase platelet responsiveness in whole blood platelet aggregometry which is consistent with our results[21].

One important observation was the presence of platelet agglutination in both patients and in the mouse model of colitis, indicating that other plasmatic factors were playing an important role in the interplay between platelet action and coagulation. Previous studies identified VWF as one of these potential factors [17,18]. VWF is a multimeric plasma glycoprotein that plays a crucial role in bridging platelets and anchoring them to the site of vascular injury to limit blood loss [22]. VWF increase is well identified to be associated with disease activity in IBD patients [23]. We confirmed this plasmatic increase of VWF in mice treated with DSS and in IBD patients. One important novelty of our study is that we identified for the first time the presence of active VWF in 20% of all patients while it remains undetectable in healthy volunteers. Active VWF represents circulating VWF that is in its platelet binding conformation, a form that is normally adopted solely when VWF is bound to the subendothelium following vascular injury[13]. The presence of active VWF has been identified in a number of pathological situations associated with increased thrombotic risk[24], and its identification in a subset of IBD patients is a clear indication that VWF plays a central role in hypercoagulability associated with IBD. This may be useful toward identification of patients at risk for thrombosis who might benefit from preventive anticoagulant treatment. Larger cohort studies are necessary to validate active VWF as marker for thrombosis risk in IBD.

To decipher the involvement of VWF in colitis procoagulant phenotype, we used VWF KO mice treated with DSS. Since in VWF KO mice DSS platelet agglutination was lowered this confirmed the central implication of VWF in the formation of large platelet agglutinates. In thrombin generation assays in PRP, the thrombin peak was lower in VWF KO mice, consistent with the decrease in factor VIII due to VWF deficiency. However, what is very striking is that DSS treatment did not lead to increased thrombin generation ($p > 0.99$) in contrast to what is observed in control mice, indicating that VWF contributes to the platelet-dependent procoagulant phenotype in IBD.

Interestingly, despite this protection against an increased pro-coagulant phenotype, VWF KO mice developed a more severe colitis than controls and intestinal lesions were worsened. These results may seem contradictory, but they emphasize the dual

role of VWF in hemostasis and inflammation. Recent studies highlighted different cellular roles of VWF on vascular smooth muscle migration or wound healing [25,26]. Thus, inhibition of VWF, despite its beneficial effect on protecting against thrombosis, may lead to aggravated tissue damage via limitation of inflammation inhibition and wound healing. Such an observation is unfortunately very reminiscent of the pathophysiology of IBD patients who may develop intestinal bleedings, despite being at increased risk of thrombosis. Therein lies the difficulty in developing new treatment for IBD which need to accommodate this co-occurrence of opposite phenotypes.

To summarize, in the present study we have identified platelets and VWF and its active form as central players in the pro-coagulant phenotype linked to increased thrombosis in IBD. Using a translational approach and prospectively enrolling 95 well-characterized IBD patients, we observed for the first time an increased thrombin generation in platelet rich plasma compared to healthy subjects as well as the presence of platelet agglutinates and active VWF in nearly 20% of all patients. To go further in the characterisation of the role of platelets and VWF we first used a mouse model of colitis in which we found an increased thrombin generation in PRP and increased platelet agglutinates as in patients without basal activation of platelet. Finally, in VWF KO mice we found a protection against the procoagulant phenotype but not against the colitis itself.

To conclude, a possible beneficial effect of VWF inhibition in IBD patients at high risk of thrombosis is counteracted by the beneficial cellular roles of VWF. Our findings will help designing new strategies aimed at preventing this life-threatening in IBD patients.

Acknowledgement: We thank Alexandre Kauskot for technical support on platelet flow cytometry experiments and Anne-Charlotte Heba for technical support on Lipocalin 2 ELISA. We thank Frances Yen Potin for English revision of the manuscript.

Author contributions:

CS, JL, MU, PC, HL, BC, FP, JP, P JL, VR, CVD performed experiments and analysed data. P JL, VR, PL, CVD, LPB designed, and supervised the study. CS, JL, wrote the first version of the manuscript. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Fédération Française de Cardiologie (FFC) and Pfizer grant program. JL was funded thanks to a grant from the Fondation pour la

Recherche Médicale (FRM), CS was funded with a grant from Région Grand Est and the French Minister of Higher Education, Research and Innovation and MUA was funded with a grant from Région Grand Est, CHRU Nancy.

References

- 1 Murthy SK, Nguyen GC. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease: an epidemiological review. *Am J Gastroenterol* 2011;**106**:713–8. doi:10.1038/ajg.2011.53
- 2 Nguyen GC, Bernstein CN, Bitton A, *et al.* Consensus statements on the risk, prevention, and treatment of venous thromboembolism in inflammatory bowel disease: Canadian Association of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2014;**146**:835-848.e6. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.042
- 3 Fumery M, Xiaocang C, Dauchet L, *et al.* Thromboembolic events and cardiovascular mortality in inflammatory bowel diseases: a meta-analysis of observational studies. *J Crohns Colitis* 2014;**8**:469–79. doi:10.1016/j.crohns.2013.09.021
- 4 Kirchgesner J, Beaugerie L, Carrat F, *et al.* Increased risk of acute arterial events in young patients and severely active IBD: a nationwide French cohort study. *Gut* 2018;**67**:1261–8. doi:10.1136/gutjnl-2017-314015
- 5 Lagrange J, Lacolley P, Wahl D, *et al.* Shedding Light on Hemostasis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* Published Online First: 20 January 2020. doi:10.1016/j.cgh.2019.12.043
- 6 Olivera PA, Zuiily S, Kotze PG, *et al.* International consensus on the prevention of venous and arterial thrombotic events in patients with inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* Published Online First: 27 August 2021. doi:10.1038/s41575-021-00492-8
- 7 Grainge MJ, West J, Card TR. Venous thromboembolism during active disease and remission in inflammatory bowel disease: a cohort study. *Lancet* 2010;**375**:657–63. doi:10.1016/S0140-6736(09)61963-2
- 8 Denis C, Methia N, Frenette PS, *et al.* A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**:9524–9. doi:10.1073/pnas.95.16.9524
- 9 Kökten T, Gibot S, Lepage P, *et al.* TREM-1 Inhibition Restores Impaired Autophagy Activity and Reduces Colitis in Mice. *J Crohns Colitis* 2018;**12**:230–44. doi:10.1093/ecco-jcc/jjx129
- 10 Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, *et al.* Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993;**69**:238–49.
- 11 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. doi:10.1159/000071638
- 12 Dargaud Y, Spronk HMH, Leenders P, *et al.* Monitoring platelet dependent thrombin generation in mice. *Thromb Res* 2010;**126**:436–41. doi:10.1016/j.thromres.2010.08.007
- 13 Hulstein JJJ, de Groot PG, Silence K, *et al.* A novel nanobody that detects the gain-of-function phenotype of von Willebrand factor in ADAMTS13 deficiency and von Willebrand disease type 2B. *Blood* 2005;**106**:3035–42. doi:10.1182/blood-2005-03-1153
- 14 Moolenbeek C, Ruitenbergh EJ. The “Swiss roll”: a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab Anim* 1981;**15**:57–9. doi:10.1258/002367781780958577
- 15 Riley SA, Mani V, Goodman MJ, *et al.* Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991;**32**:174–8. doi:10.1136/gut.32.2.174
- 16 Gower-Rousseau C, Sarter H, Savoye G, *et al.* Validation of the Inflammatory Bowel Disease Disability Index in a population-based cohort. *Gut* 2017;**66**:588–96. doi:10.1136/gutjnl-2015-310151

- 17 Ruggeri ZM, Pareti FI, Mannucci PM, *et al.* Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 1980;**302**:1047–51. doi:10.1056/NEJM198005083021902
- 18 Chow TW, Turner NA, Chintagumpala M, *et al.* Increased von Willebrand factor binding to platelets in single episode and recurrent types of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1998;**57**:293–302. doi:10.1002/(sici)1096-8652(199804)57:4<293::aid-ajh5>3.0.co;2-p
- 19 Shen J, Ran ZH, Zhang Y, *et al.* Biomarkers of altered coagulation and fibrinolysis as measures of disease activity in active inflammatory bowel disease: A gender-stratified, cohort analysis. *Thrombosis Research* 2009;**123**:604–11. doi:10.1016/j.thromres.2008.04.004
- 20 Yan SLS, Russell J, Harris NR, *et al.* Platelet abnormalities during colonic inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2013;**19**:1245–53. doi:10.1097/MIB.0b013e318281f3df
- 21 Schmid W, Vogelsang H, Papay P, *et al.* Increased responsiveness to thrombin through protease-activated receptors (PAR)-1 and -4 in active Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2014;**8**:495–503. doi:10.1016/j.crohns.2013.11.001
- 22 Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 2015;**125**:2019–28. doi:10.1182/blood-2014-06-528406
- 23 Cibor D, Owczarek D, Butenas S, *et al.* Levels and activities of von Willebrand factor and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif, number 13 in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2017;**23**:4796–805. doi:10.3748/wjg.v23.i26.4796
- 24 Groot E, de Groot PG, Fijnheer R, *et al.* The presence of active von Willebrand factor under various pathological conditions. *Curr Opin Hematol* 2007;**14**:284–9. doi:10.1097/MOH.0b013e3280dce531
- 25 O'Donnell JS, O'Sullivan JM. von Willebrand factor promotes wound healing. *Blood* 2019;**133**:2553–5. doi:10.1182/blood.2019001175
- 26 Lagrange J, Worou ME, Michel J-B, *et al.* The VWF/LRP4/ α V β 3-axis represents a novel pathway regulating proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* Published Online First: 12 February 2021. doi:10.1093/cvr/cvab042

Figures and Figure legends

Figure 1

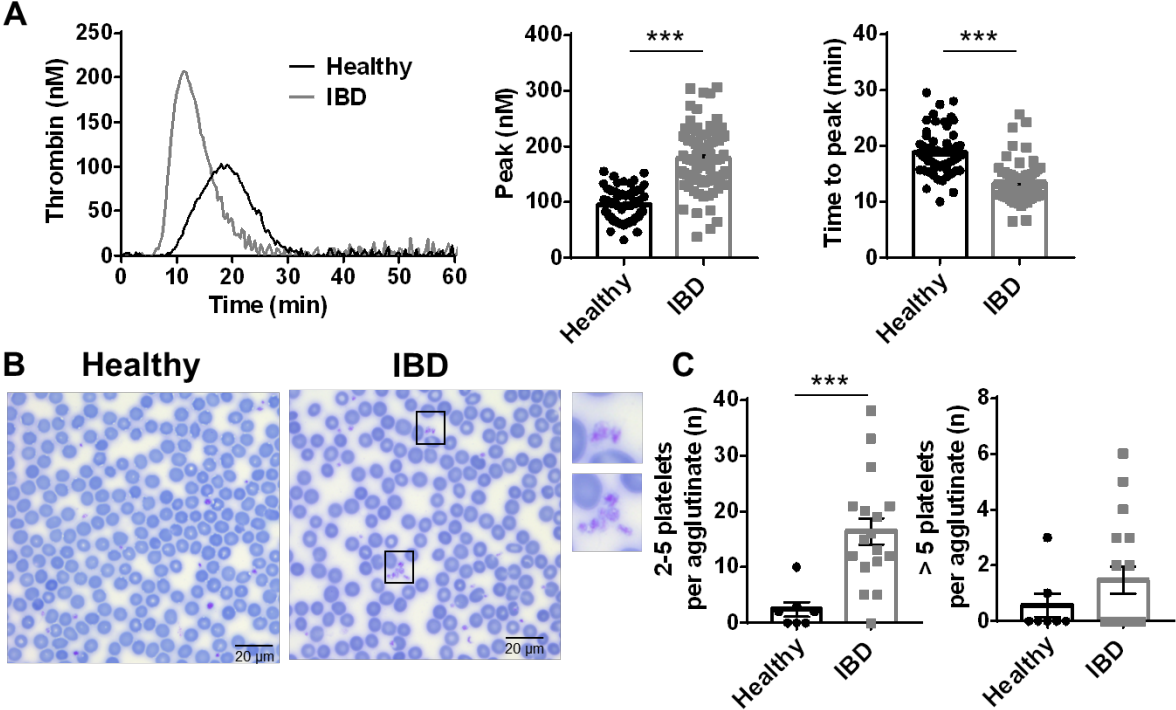


Figure 1. Thrombin generation and platelet agglutinates in IBD patients. (A) Thrombin generation in platelet-rich plasma with peak and time to peak parameters from healthy volunteers (n=55) and IBD patients (n=85), unpaired t test. (B) Representative images of control and IBD patients' blood smears and example of platelet agglutinates size: 1: 2-5 platelets, 2: more than 5 platelets. (C) Agglutinates of 2-5 and more than 5 platelets were counted on 5 independent fields per healthy volunteer (n=7) or IBD patients (n=17) objective 60x, Mann-Whitney test. ETP: endogenous thrombin potential. Data are presented as mean ± SEM.

Figure 2

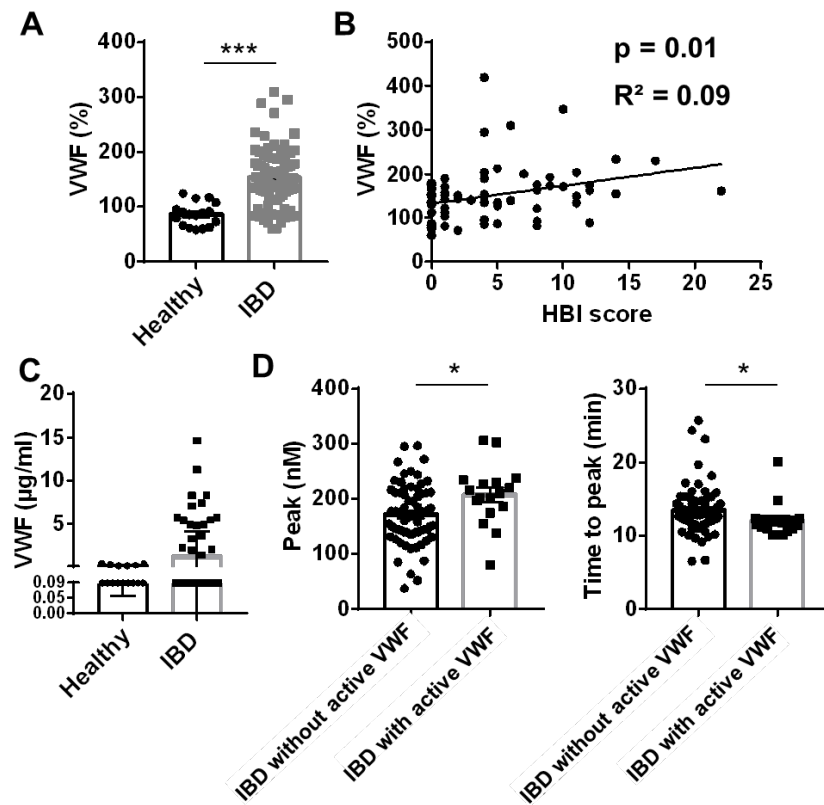


Figure 2. Active VWF is present in IBD patients. (A) Plasma concentration of total VWF in healthy volunteers $n=19$ and IBD patients $n=88$, Mann-Whitney test. (B) Correlations between total VWF plasma concentration and Crohn's disease patients' activities, Pearson correlation coefficient. (C) Plasma concentration of active VWF compared to healthy subjects (limit of detection: $0.09 \mu\text{g/ml}$). (D) Comparison of thrombin generation peak and time to peak in IBD patients with and without active VWF. $n = 68$ patients without and 17 patients with active VWF, Mann-Whitney test. Data are presented as mean \pm SEM.

Figure 3

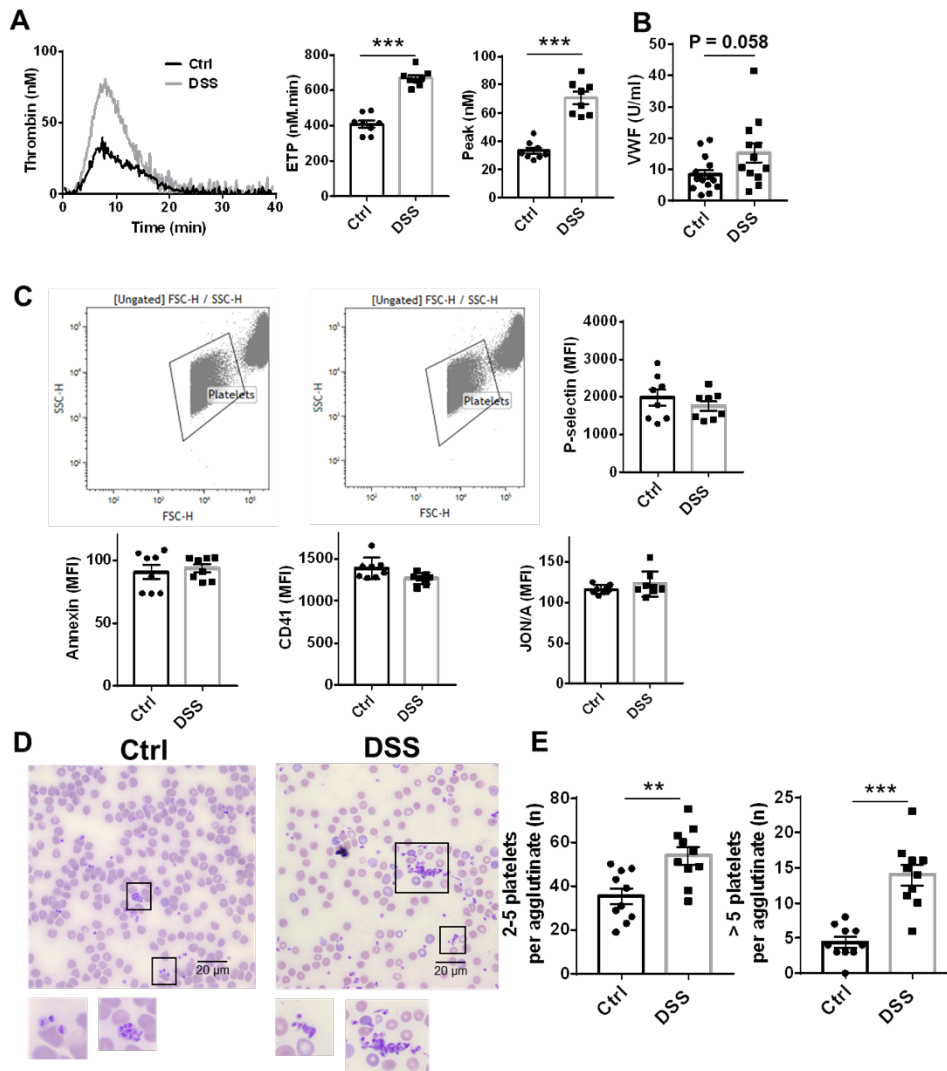


Figure 3. Thrombin generation and platelet phenotype in DSS-treated mice. (A) Thrombin generation in platelet-rich plasma from control and DSS-treated mice with ETP and peak parameters, unpaired t test. (B) Total plasma concentration of VWF in control and DSS-treated mice, Mann-Whitney test. (C) Whole blood flow cytometry on resting platelets. Platelet population was gated with GPIIb/IIIa and platelet activation was assessed with P-selectin, Annexin V and inactivated/activated forms of integrin α IIb β 3 CD41 (GPIIb) and JON/A. Platelet agglutination count was measured on blood smears. (D) Representative images of control and DSS blood smears. (E) Agglutinates of 2-5 and more than 10 platelets were counted on 5 independent fields per mouse objective 60x, unpaired t test. ETP: endogenous thrombin potential. Data are presented as mean \pm SEM. n = 8-10 per group. **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 4

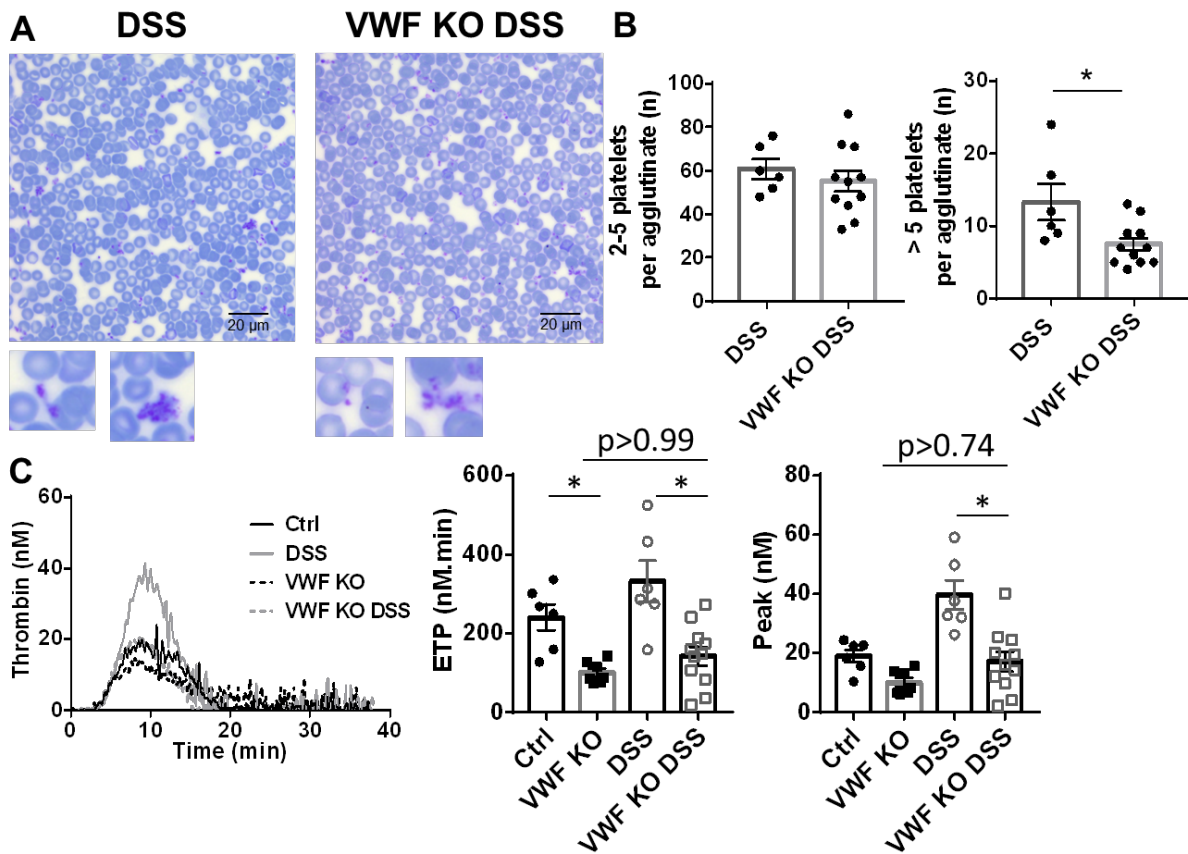


Figure 4. Platelet agglutination and thrombin generation in VWF KO mice treated with DSS. (A) Representative images of control and DSS blood smears. (B) Agglutinates of 2-5 and more than 10 platelets were counted on 5 independent fields per mouse, objective 60x, Mann-Whitney test. (C) Thrombin generation in platelet-rich plasma from control and DSS-treated VWF KO mice with ETP and peak parameters, Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison tests. Data are presented as mean \pm SEM. For mice experiments n = 6-11 per group *p<0.05, **p<0.01.

Figure 5

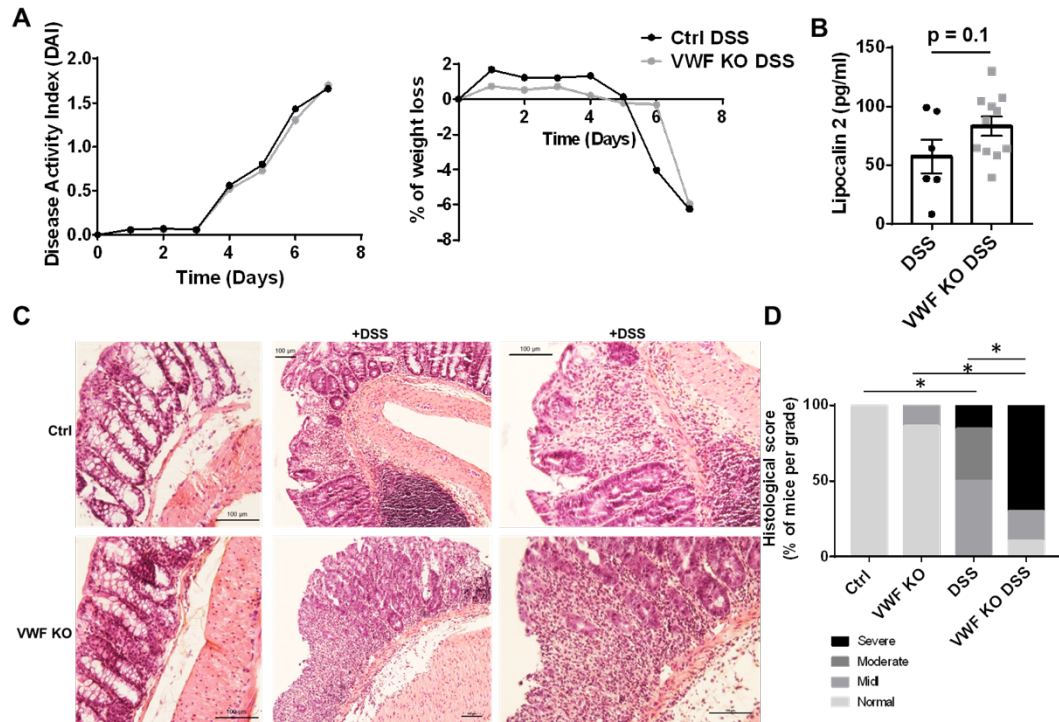
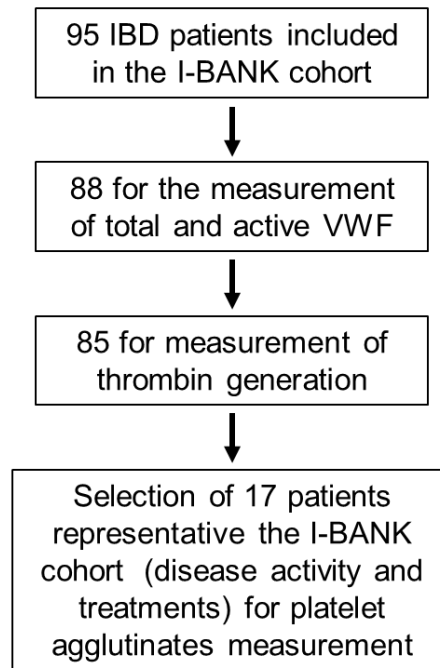


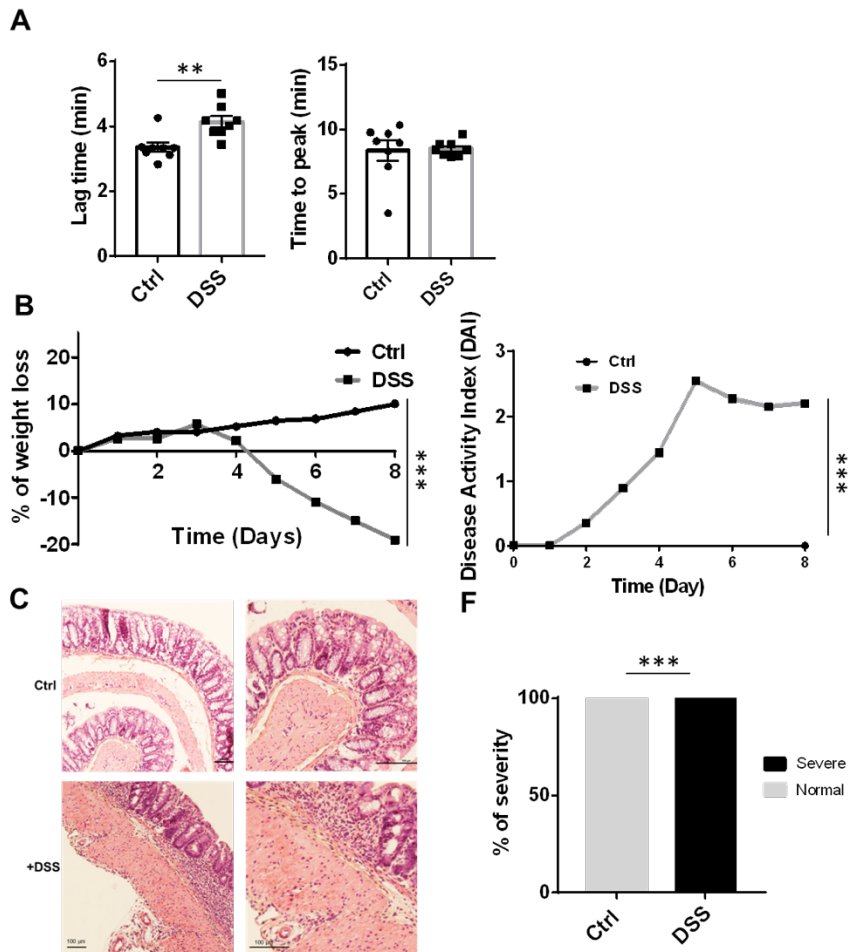
Figure 5. Colitis phenotype in VWF KO mice treated with DSS. (A) Weight and disease activity index (DAI) of control and DSS-treated VWF KO mice. (B) Lipocalin 2 concentration in colonic tissue from control and DSS-treated VWF KO mice, t test. (C) Representative histological section of colon and (D) histological score analysis, Ki2 test. Data are presented as mean \pm SE, n = 6-11 per group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Supplementary figure 1



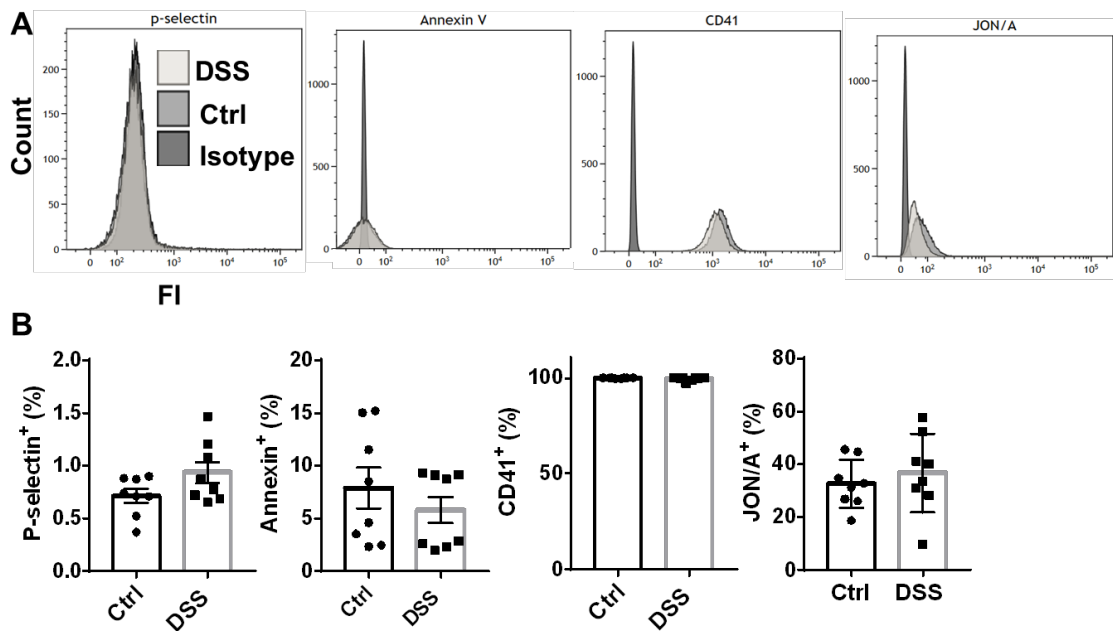
Supplementary Figure 1. Patient distribution from the I-BANK cohort among experiments

Supplementary figure 2



Supplementary Figure 2. Thrombin generation parameters and colitis phenotype of DSS-treated mice. (A) Thrombin generation parameters for platelet-rich plasma performed in control and DSS-treated mice, Mann-Whitney test. (B) Weight and disease activity index (DAI) of control and DSS treated mice, unpaired t test. (C) Histological section of colon and histological score analysis, Ki2 test. Data are presented as mean \pm SEM. n = 8-10 per group, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Supplementary figure 3



Supplementary Figure 3. Flow cytometry parameters on platelets from DSS-treated mice. (A) Flow cytometry charts and (B) percentage of positive cells for GPIIb β , P-selectin, Annexin V, CD41 (GPIIb) and JON/A. Data are presented as mean \pm SEM. n = 8 per group

Supplementary Table 1. Blood count of mice treated with DSS.

	Ctrl	DSS
n	18	18
RBC ($10^6 / \text{mm}^3$)	9.5 ± 0.1	9.2 ± 0.2
Hematocrit (%)	45.4 ± 0.6	41.9 ± 1.1
Hemoglobin (g/dl)	14.1 ± 0.2	13.3 ± 0.3
MCV (μm^3)	47.5 ± 0.2	45.5 ± 0.1***
Platelets ($10^3 / \text{mm}^3$)	785 ± 24	1084 ± 82**
MPV (μm^3)	6.6 ± 0.3	5.9 ± 0.4
WBC ($10^3 / \text{mm}^3$)	3.0 ± 0.3	3.7 ± 0.5

RBC: red blood cells; MCV: mean corpuscular volume; MPV: mean platelet volume;
WBC: white blood cells, t test.

Supplementary Table 2. VWF KO mice blood count.

	Ctrl	VWF KO	DSS	VWF KO DSS
n	7	7	6	11
RBC ($10^6 / \text{mm}^3$)	8.1 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7.4 ± 0.4	7.4 ± 0.4
Hematocrit (%)	38.7 ± 0.5	36.8 ± 0.6	34.7 ± 1.9	34.6 ± 1.3
Hemoglobin (g/dl)	12.4 ± 0.1	11.7 ± 0.2	10.9 ± 0.6	10.7 ± 0.4
MCV (μm^3)	47.9 ± 0.4	46.9 ± 0.7	46.5 ± 0.7	47.3 ± 1.2
Platelets ($10^3 / \text{mm}^3$)	961 ± 75	1004 ± 60	1125 ± 81	1168 ± 62
MPV (μm^3)	4.7 ± 0.04	4.6 ± 0.03	4.8 ± 0.02	4.7 ± 0.03
WBC ($10^3 / \text{mm}^3$)	2.4 ± 0.4	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.2	2.3 ± 0.2

RBC: red blood cells; MCV: mean corpuscular volume; MPV: mean platelet volume;
WBC: white blood cell.

Durant ma thèse, j'ai pu participer à un autre projet qui est une collaboration avec l'équipe du Dr. Cécile Denis à l'unité INSERM 1176. L'objectif de ce projet est d'étudier l'hypercoagulabilité potentielle d'un traitement de l'hémophilie A, l'émicizumab, associé ou non avec d'autres thérapies. L'article est en cours d'écriture, je suis co-auteur avec Sénadé Atsou qui entame actuellement sa 3^{ème} année de thèse au sein de l'unité INSERM 1176 sous la direction du Dr. Olivier Christophe.

L'article est en cours de rédaction.

Résumé du projet :

L'hémophilie A est une maladie hémorragique héréditaire rare due à un déficit congénital du Facteur VIII (FVIII) de la coagulation. Cette protéine est codée par un gène de 186 kb situé au niveau du Xq28 du chromosome X. La transmission de la maladie est récessive et liée au chromosome X

La fréquence de l'hémophilie A est estimée à environ 1 à 2 naissance masculine sur 10000. Il existe trois degrés de sévérité définis par l'activité résiduelle du FVIII : <1 % de FVIII pour les hémophiles sévères, entre 1 et 5 % pour les modérés et entre 5 et 40 % en ce qui concerne les hémophiles mineures.

Cliniquement, les patients hémophiles A présentent des épisodes hémorragiques internes non contrôlés. La sévérité et la fréquence de ces épisodes dépendent directement du taux de FVIII plasmatique circulant. Chez les hémophiles sévères, le déficit très marqué en FVIII entraîne des hémorragies spontanées en particulier au niveau des articulations et des tissus mous (peau, tendons, ligaments, muscles). D'autres manifestations hémorragiques peuvent survenir, notamment des saignements intracrâniens à la naissance, mais en général, les manifestations hémorragiques n'apparaissent que lors de l'apprentissage de la marche.

Chez les patients hémophiles mineurs, les saignements ne sont pas spontanés et font suite en général à un traumatisme grave ou à une intervention chirurgicale, tandis que chez les patients hémophiles modérés, des saignements peuvent survenir après des traumatismes peu importants.

Le traitement de l'hémophilie A est substitutif et consiste en une prophylaxie palliant le déficit en FVIII. Elle consiste en l'administration par voie intraveineuse de concentrée de FVIII. Ce traitement s'est avéré efficace dans la gestion des saignements dans l'hémophilie A. Toutefois, les administrations étant fréquentes, les accès veineux peuvent devenir difficiles et mener à un niveau de soins insatisfaisant pour les personnes qui ne sont pas en mesure d'adhérer à une stratégie thérapeutique comme celle-ci.

Par ailleurs, 15 à 30 % de patients atteints d'hémophilie A développeront des inhibiteurs du FVIII exogène. Ces inhibiteurs compromettent la capacité du patient à gérer les hémorragies, ce qui entraîne une morbidité accrue et un coût élevé de traitement du patient. L'induction de la tolérance immunitaire (ITI) est actuellement la seule approche réussie pour traiter ces inhibiteurs mais elle est difficile, très coûteuse et échoue chez 25-30% des patients. Les épisodes hémorragiques et la nécessité d'une intervention chirurgicale chez les patients porteurs d'inhibiteurs sont gérés à l'aide d'agents de dérivation comme le facteur FVII activé recombinant (rFVIIa) et un concentré de complexe prothrombique activé (aPCC) qui agissent indépendamment du FVIII dans la cascade de la coagulation en générant de la thrombine. Cependant, ces traitements n'éliminent pas les saignements ou ne parviennent pas à contrôler les saignements aigus chez tous les patients présentant des inhibiteurs.

L'Émicizumab offre une nouvelle approche thérapeutique. Il s'agit d'un anticorps monoclonal bispécifique qui associe le facteur IX (FIX) activé et le facteur X (FX) pour permettre l'activation de ce dernier, restaurant ainsi la fonction hémostatique du FVIII absent chez les patients atteints d'hémophilie A. Étant donné que l'Émicizumab est une IgG humaine, il a une demi-vie d'environ 3 semaines et est considéré comme le meilleur pour la prophylaxie de routine. Un avantage supplémentaire de l'Émicizumab par rapport au FVIII est la possibilité de l'injecter par voie sous-cutanée, ce qui entraîne une grande amélioration de la qualité de vie par rapport aux injections intraveineuses. L'Émicizumab ne fournit cependant pas plus de 15 à 20 % de l'activité de type FVIII et peut ne pas être suffisamment protecteur chez les patients subissant une intervention chirurgicale majeure ou en cas de traumatisme. Si nécessaire, les patients sous traitement prophylactique par Émicizumab peuvent être co-traités par le rFVIII. Cependant, l'association de l'Émicizumab avec un agent de dérivation pourrait être associée à un risque thrombotique. Plusieurs études cliniques dans le programme HAVEN ont montré des microangiopathies et des événements thrombotiques notamment après l'administration d'aPCC à des patients sous Émicizumab. Des études *in-vitro* et *ex-vivo* ont montré que l'association de l'Émicizumab et de l'aPCC à des doses cliniquement pertinentes, a un effet synergique important sur la génération de thrombine, tandis que l'association avec le rFVIIa a entraîné une génération de thrombine inférieure à la normale. A ce jour, le mécanisme qui engendre ce risque thrombotique reste inconnu et aucune de ces études *in-vitro* et *ex-vivo* précédentes n'a pris en compte le rôle potentiel du système vasculaire dans la régulation de la coagulation. L'Émicizumab n'est pas connu pour se lier directement aux cellules du système vasculaire et, dans des conditions physiologiques, l'endothélium prévient la thrombose en fournissant une surface qui décourage la fixation des cellules et des protéines de coagulation.

A potential thrombotic angiopathy is observed in FVIII deficient plasma when aPCC was added to Emicizumab in an in vitro approach

Célia Schellenberg*[§], Sénadé Atsou^{†§}, Jeremy Lagrange*, Patrick Lacolley*, Peter J Lenting[†], Cécile V Denis[†], Olivier D Christophe^{†‡}, Véronique Regnault*[‡].

* DCAC, UMR_S1116, INSERM, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

† HITH, UMR_S1176, INSERM, Université Paris-Saclay, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France.

§ These authors contributed equally to this work as first authors

‡ These authors contributed equally to this work as senior authors

Corresponding author:

Abstract: 250 words

Main text (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion): 3 730 words

Tables: 4

Figures: 6

References: 40

Running title: Hypercoagulability on vascular cells with Emicizumab and aPCC

Abstract

Introduction: Thrombotic events can occur in hemophilia patients when, within bleeding, emicizumab is used combined with bypassing agent (BPA) such as reported in HAVEN studies with activated prothrombin complex (aPCC). Mechanism of these thrombotic events is still uncertain.

We designed this study to evaluate the potential hypercoagulability of Emicizumab, combined or not with FVIII, rFVIIa, and aPCC considering the potential role of vascular cells.

Methods: Aortic endothelial cells (AECs), activated or not, or vascular smooth muscle cells (VSMCs) were seeded and grown in tissue culture plates. Over, distinct thrombin generation (TG) parameters were measured of a FVIII deficient plasma following in vitro spiking of Emicizumab at therapeutic dose or of FVIII, FVIIa, or aPCC, alone or combined with Emicizumab.

Results: When aPCC was added to FVIII deficient plasma with Emicizumab, TG considerably increased. This increase was more prominent on stimulated AECs, (> 24-fold increase), than on resting AECs (>8.0x) or VSMCs (> 4.5x). TG was found far above than in normal plasma or plasma containing normal level of FVIII (100 U/dL). Addition of rFVIIa to FVIII deficient plasma with Emicizumab increased TG on resting and stimulated AECs compared with rFVIIa alone but the effect remained below than in normal plasma. No increase was observed on VSMCs. Addition of FVIII to Emicizumab induced a TG equivalent to observed without Emicizumab, irrespective to the vascular cells.

Conclusion: Our data demonstrate potential thrombotic angiopathy in hemophilia when aPCC was added to Emicizumab, in an in vitro approach, despite the presence of coagulation inhibitors displayed by vascular cells.

Introduction

Hemophilia A (HA) is an X-linked bleeding disorder caused by defects in the gene encoding factor VIII (FVIII), affecting 1-2 per 10,000 male births. Replacement therapy using plasma-derived or recombinant FVIII-concentrates has proven to be effective in the management of bleedings in hemophilia A^{1,2}. Nevertheless, replacement therapy may represent a burden to the patients, because of frequent intravenous administrations necessary for the prophylactic treatment and challenges in maintaining venous access which results in an unsatisfactory level of care for persons who are unable to adhere to this strategy. Furthermore, 15%-30% of HA patients will develop inhibitors to exogenous FVIII. Inhibitors compromise the ability to manage hemorrhages, resulting in increased morbidity and elevated cost of their management, especially in patients with high titer inhibitors. Immune tolerance induction (ITI) is presently the only successful approach for inhibitor eradication³ which is challenging for patients/families, very expensive, and fails in 25–30% of patients⁴. Bleeding episodes and need for surgery in inhibitor patients are managed using bypassing agents (BPA) that act independently of FVIII in the coagulation cascade generating thrombin. The most commonly used BPA are recombinant activated factor VII (rFVIIa, NovoSeven; Novo Nordisk, USA) and activated prothrombin complex concentrate (aPCC, FEIBA; Takeda, USA). However, both aPCC and rFVIIa do not eliminate bleeding or successfully control acute bleeds in all patients with inhibitors^{5,6}.

Emerging non-factor products such as Emicizumab (Hemlibra®, Roche, USA and Chugai Pharmaceutical Co, Japan) offer an alternative approach for patients with HA and inhibitors⁷.

Emicizumab is the first non-factor replacement product and was approved in 2018 by the US FDA and the European Medicines Agency as prophylaxis for patients with HA, both with and without FVIII inhibitors. It is a bispecific monoclonal antibody that brings together activated Factor IX (FIX) and Factor X (FX) to restore the haemostatic function of the absent FVIII in HA patients^{7,8}. Clinical studies have shown that Emicizumab strongly reduces the bleeding tendency in severe hemophilia A-patients with or without inhibitory antibodies⁹, providing evidence that Emicizumab sufficiently stimulates FIXa activity to compensate for the absence of FVIII.

Nonetheless, Emicizumab and FVIII are very different proteins in terms of structure and regulation. Several unknowns remain, with particular reference to the effective

FVIII-like activity of Emicizumab ¹⁰. Thus, when breakthrough bleeding episodes occur during Emicizumab treatment, patients require treatment with BPA. However, there could be an additional thrombotic risk associated with combining Emicizumab with BPA. Three microangiopathies in HAVEN 1 due to co-administration of Emicizumab and aPCC and thrombotic events, two in HAVEN 1 and one each in HAVEN 2 and 3 whereas no complications were reported when patients with inhibitors received Emicizumab and rFVIIa ⁹. Several recent in vitro and ex vivo analyses suggested a plausible explanation for these observations showing that combination of Emicizumab (or Sequence Identical Analogue) and aPCC at clinically relevant doses have a strong synergistic effect on thrombin generation whereas the combination with rFVIIa, instead of with aPCC resulted in thrombin generation below normal ¹¹⁻¹⁴. However, the mechanism of these thrombotic events is still uncertain and none of these previous in vitro and ex vivo studies considered the potential role of the vascular system in the regulation of the coagulation. Emicizumab is not known to bind directly to the cells of the vasculature, and under physiological conditions the endothelium prevents thrombosis by providing a surface that discourages the attachment of cells and clotting protein ¹⁵.

The objective of the present study was to address the potential hypercoagulability of Emicizumab, combined or not with HA therapies, especially FVIII, rFVIIa, and aPCC considering the potential role of vascular cells. Therefore, endothelial cells, activated or not by tumor necrosis factor alpha (TNF), or vascular smooth muscle cells were seeded and grown in 96-well tissue culture plates. Distinct thrombin generation (TG) parameters were measured of a FVIII deficient plasma following in vitro spiking of Emicizumab at a therapeutic dose and of different concentrations of FVIII, FVIIa, and aPCC, alone or combined with Emicizumab.

Materials and Methods

Cell culture

Primary human aortic endothelial and vascular smooth muscle cells (AECs and VSMCs) were purchased from Lonza and grown in Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit™ and SmGM™- 2 Smooth Muscle Cell Growth Medium -2 BulletKit™ (Lonza, Basel, Switzerland), respectively during 3 passages. Cells were used between passages 3 to 7 to reduce phenotypic drift. Cells (7500/well) were seeded in 96-well tissue culture flat-bottom plates, (MICROTEST™96), grown to subconfluence a day before use. It has been previously established by our team that cells seeded above 2500/well allows to obtain homogeneous thrombin generation parameters, not influenced by the number of cells seeded whereas the phospholipid-related procoagulant activity (PPA, PS equivalents) and the tissue factor (TF) activity are influenced by the number of cells. Cells were washed with 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7.35 containing 5 g/L albumin (HBS) before use. In some experiments, AECs were activated by incubating with 5 nM TNF-alpha in growth medium for 4 hours just before use.

Flow cytometry

Cells were harvested with trypsin-EDTA and then incubated 1h with an anti-endothelial Protein C receptor or EPCR (563624) from BD Biosciences or the anti-TF (TF9-10H10) from Bio-Techne in PBS/BSA 1%. After washing, cells were resuspended in PBS/BSA1% and measurement was performed with Celesta Sorp flow cytometer (Becton Dickinson). Cells (10 000) were routinely counted, and cell population was defined based on forward-side scatter characteristics. Data were analyzed with the Kaluza analysis 2.1 software. Non labelled cells were used as negative controls

Antigen and activity assays

Tissue factor (TF) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) activities were measured in 200 µL HBS incubated for 1 h at room temperature with AECs or VSMCs using the Actichrome® tissue factor and Actichrome® TFPI activity assay respectively (American Diagnostica, Stamford, CT). To measure cell surface TF or TFPI activity, washed adherent cells were overlaid with HBS. The reaction was stopped with glacial acetic acid and the absorbance read at 405 nm.

The chromogenic assay measuring the PPA in AECs and VSMCs was performed as described previously for VSMCs¹⁶. Briefly, washed adherent cells were incubated with 50 μ L of 20 mM HEPES, pH 7.35 containing 60 g/L bovine serum albumin (BSA), 50 μ L of FXa-FVa-CaCl₂ and 50 μ L of bovine prothrombin (6 μ M) plus Z-Gly-Gly-Arg-AMC substrate (1.25 mM) in 20 mM HEPES pH 7.35 containing 60 g/L BSA. The plate was placed in the Fluoroskan Ascent fluorometer and allowed to warm to 37°C for 5 min before kinetic readings were taken over 10 min. Phospholipid concentration was estimated from the initial rate of thrombin formation by reference to a standard curve constructed with a mixture of phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) (20:20:60 mole%), and expressed as PS equivalents. The Quantikine Human Thrombomodulin Immunoassay from R&D Systems (BDCA-3) was used to measure human Thrombomodulin in cell culture lysates as described by the provider.

Thrombin generation

Lyophilized FVIII deficient plasma purchased from SYSMEX/HYPHEN Biomed was reconstituted with distilled water and kept for 30 min at room temperature. FVIII (Advate, Takeda); FVIIa (Novoseven, Novo Nordisk) activated prothrombin complex concentrate or aPCC (FEIBA, Takeda) and Emicizumab (Hemlibra, Roche-Shugai) were diluted at different concentration in FVIII deficient plasma, see below for the dilutions, and supplemented plasma was kept on ice up to 30 minutes before use.

To measure thrombin generation the method described by Hemker et al., was used except that thrombin generation was initiated by the contact of the FVIII deficient plasma, supplemented or not with FVIII or bypassing agents, with vascular cells prepared as described above, in polypropylene 96-well microtiter plates (Nunc, Thermo Fischer Scientific). Briefly, FVIII deficient plasma was spiked with varying concentrations of FVIII (10, 25, 50, 100, and 150 U/dL which more or less corresponds to the following doses 5, 12.5, 25, 50, and 75 mg/kg, respectively) or FVIIa (1, 2.5, and 5 μ g/mL which more or less corresponds to the following doses 60, 150, and 300 μ g/kg, respectively) or aPCC (1, 2, 4 U/mL which more or less corresponds to the following doses 100, 200 and 400 U/kg, respectively) and with or without emicizumab at 50 μ g/mL which corresponds approximately to the therapeutic dose of 3mg/kg of the bypassing agent (Table 1). Then, these plasma preparations were added and the plate was warmed to 37 °C for 5 minutes in the pre-equilibrated plate-reader. Thrombin

generation was initiated with pre-warmed Fluo-substrate that contained calcium and buffer. Thrombin progress curves were recorded continuously with a microtiter-plate fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland) under control of Thrombinoscope software (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands), filtered for excitation at 390 nm and emission at 460 nm. A calibrator assay was done using FVIII deficient plasma included on wells with a solution that contained a known concentration of thrombin- α 2-macroglobulin complex (thrombin calibrator, Stago, France). Each plasma sample and calibrator were assayed in triplicate for analysis.

Data analysis

All data were presented as mean \pm standard deviation (SD) unless stated otherwise. The statistical difference between groups was analyzed using either a One-Way ANOVA with multiple comparisons or Kruskal-Wallis Test with multiple comparisons or as stated in figure legends using Prism 7 (GraphPad Software Inc).

Results

We analyzed the values of distinguishing TG parameters on different vascular cells, AECs, stimulated or not with TNF-alpha, and VSMCs of a FVIII deficient plasma following in vitro spiking of Emicizumab at a therapeutic dose (50 µg/mL) and of different concentrations of FVIII, FVIIa, and aPCC, alone or combined with 50 µg/mL of Emicizumab.

TG on resting AECs

As expected, an almost undetectable level of thrombin generation was noted on resting AECs for the FVIII deficient plasma alone (see Tables 2, 3 and 4 for summary of FVIII, FVIIa, and aPCC spiking experiments, respectively). When spiked in FVIII deficient plasma, both, FVIII, FVIIa, and aPCC alone showed a concentration-dependent effect on thrombin generation (Tables 2, 3 and 4). The mean values of thrombin peak (figure 1) and ETP were found increased as a function of the agents' concentration while the mean values of time to peak (Figure 2) and lag time were decreased (Tables 2, 3, and 4). However, the extent of thrombin generation was very different between each hemophiliac therapy.

At a therapeutic dose, alone, FVIII (100 U/dL) was generating significantly more thrombin than aPCC (1U/mL), Emicizumab (50 µg/mL) or FVIIa (2.5 µg/mL) alone (Figure 3). Of note, the generation of thrombin was not shown to be greater or more rapid when FVIII, at all doses tested was combined or not with a therapeutic dose of Emicizumab (Figures 1, 2, and 3A, Table 2). Thus, at a therapeutic dose, Emicizumab alone displayed a lower ability than FVIII to generate thrombin, and combined to it, Emicizumab did not show any capacity to increase FVIII procoagulant activity.

At the opposite to FVIII, at all FVIIa doses tested on resting AECs, thrombin generation was lower and slower than observed for Emicizumab alone at a therapeutic dose (Figures 1, 2, and 3A, Table 3). Combined, Emicizumab and FVIIa showed synergistic potential to generate more and faster thrombin than alone (Figures 1, 2, and 3B, Table 3).

Alone, aPCC at all doses tested displayed a similar or slightly higher capacity to generate thrombin than Emicizumab alone at a therapeutic dose (Figures 1, 2, and 3C, and Table 4). However, combined to Emicizumab and at all clinically relevant doses of aPCC tested excess thrombin generation was noted. Only at the dose of 1IU/mL of

aPCC thrombin generation parameters were measurable. At higher doses, the results were above the detection limit of the thrombin generation assay used in this study (Table 4).

TG on stimulated AECs

Results similar to what was obtained on unstimulated AECs were found on AECs stimulated by TNF-alpha. An undetectable level of thrombin generation was observed on resting AECs for the FVIII deficient plasma alone and both, FVIII, FVIIa, and aPCC alone showed a concentration-dependent effect on thrombin generation (Figures 1, 2 and Table 4). Furthermore, the extent of thrombin generation was very different between each therapy (Figure 4). Interestingly, on stimulated AECs, not only FVIII but aPCC, at all doses tested were generating significantly more and faster thrombin than Emicizumab alone at 50 µg/mL whereas FVIIa at all doses tested displayed a similar or slightly higher capacity to generate thrombin than Emicizumab alone (Tables 2, 3 and 4, Figures 1, 2 and 4). Thus, Emicizumab, alone, at a therapeutic dose was not generating more thrombin on stimulated AECs than on unstimulated, at the opposite to what was observed for FVIIa and aPCC. These differences of thrombin generated on stimulated and unstimulated AECs by FVIII deficient plasma spiked with different agents could be explained by the different level of expression of several modulators of coagulation at their surfaces.

To address this possibility, we measured as described in the experimental procedures, the level of expression at the cell surface of EPCR, TF, TFPI and TM and the concentration and/or activities of TF, free TFPI, procoagulant phospholipids, and TM in cells. As shown in Figure 5B and Table 5, significantly more TF and more procoagulant phospholipids were observed for activated AECs than on unstimulated ones and inversely concerning TM. These observations were in line with a more important activity of the extrinsic pathway of the coagulation on stimulated AECs than on unstimulated ones and an intrinsic pathway favored by the higher expression of the procoagulant phospholipids but at the same time more controlled by the higher expression of TM. The combination of Emicizumab at a therapeutic dose with FVIIa, FVIII, and aPCC gave similar findings on stimulated AECs and on unstimulated ones. No additional effect of Emicizumab on FVIII capacity to generate thrombin was detected whereas additional synergetic effects were observed when Emicizumab was combined with FVIIa and aPCC, more pronounced with aPCC than FVIIa (Figures 1,

2, and 6; Tables 2, 3, and 4). Only at the dose of 1IU/mL of aPCC measurable thrombin generation parameters were measurable. At higher doses, the results were not possible to analyze (Table 4).

TG on VSMCs

On VSMCs, similar findings were obtained than those described for stimulated AECs except for few observations. First of all, the baseline level of thrombin generation from FVIII-deficient plasma is not null (Tables 2, 3, and 4, Figure 6). This probably had the first consequence that the rates of thrombin generation induced by Emicizumab alone at a therapeutic dose was higher than what was observed on the AECs stimulated or not (Figures 1 and 2, Tables 2, 3, and 4). Then, we observed that FVIIa alone has a much greater capacity than on AECs to generate thrombin. At all the FVIIa doses tested, the level of thrombin generated is higher than what was observed for Emicizumab alone (Figures 1 and 2, Table 3). In line with this observation, TF activity was found higher in VSMCs than in AECs whereas free TFPI was significantly lower (Figure 5B). Furthermore, no additional effect of Emicizumab on FVIIa and FVIII capacity to generate thrombin was distinguished whereas a synergetic effect was observed with aPCC. Additionally, we observed that the time to peak parameter was shorter on VSMCs than on AECs for the same concentration of agents spiked, alone or combined in FVIII deficient plasma (Tables 2, 3, and 4, Figures 2 and 6). Finally, a significant lower expression level of different coagulation modulators was found on VSMCs such as TM, free TFPI, EPCR whereas TF was found more expressed (Figure 5). These findings were in line with the differences of the thrombin generation observed between AECs and VSMCs submitted to the same conditions and therapeutic agents.

Discussion

In the present study, we addressed the potential hypercoagulability of Emicizumab, combined or not with HA therapies, especially FVIII, rFVIIa, and aPCC, by considering the potential role of vascular cells. Our results show that on the vascular cells tested, a state of hypercoagulability was only observed when aPCC at a dose of 1, 2 or 4 U/dL was added to FVIII-deficient plasma with Emicizumab at a therapeutic dose (50 µg/mL). On the contrary, this potentially thrombotic situation was not detected when Emicizumab was associated or not with rFVIIa or FVIII or when aPCC was used alone. Our first finding showed that the concomitant addition of Emicizumab, at a therapeutic dose (50 µg/mL), and aPCC at a minimum dose of 1 U/mL to FVIII-deficient plasma causes an excessive production of thrombin on stimulated or unstimulated AECs or on VSMCs. This is reflected through the significantly shortened onset of thrombin formation (lag time and time to thrombin peak reduced), as well as increased thrombin rate (ETP and peak thrombin boosted) compared to a situation where FVIII-deficient plasma is supplemented with 100 U/dL FVIII mimicking a normal plasma. The synergistic effect of aPCC and Emicizumab is in agreement with other *in vitro* or *ex vivo* studies reported on combination of aPCC and Emicizumab or sequence-identical analog of Emicizumab¹²⁻¹⁴ but none had so far considered the potential role of vascular cells on the TG. Our results are therefore similar and complementary to those observed so far by these studies and underline the importance of the recommendations published by various organizations regarding the management of breakthrough bleeds and surgery in emergency situations in patients with HA and inhibitors on Emicizumab prophylaxis, avoiding aPCC use if possible or only when there is a low clinical response to rFVIIa¹⁷ or limiting its use to a daily dose <100 U/kg^{18,19}. Our data are in line with a study suggesting that aPCC can be used with Emicizumab albeit with lower doses than prescribed¹⁴. To address this issue, a clinical trial is ongoing to assess the safety of a single aPCC infusion, at a low dose, in patients with HA with inhibitors (NCT04205175). In a mechanistic point of view, the excessive TG observed in our study by the combination of Emicizumab and aPCC can be explained by several mechanisms, not necessarily mutually exclusive. First, Emicizumab displays the same affinity for FIX and FIXa and for FX and FXa²⁰. Knowing that aPCC contains significant amounts of FIXa^{21,22}, increasing its concentration is sufficient to trigger the acceleration of FXa generation. Second, there is not the same activity regulation of Emicizumab-FIXa and

the FIXa-FVIIIa complexes. In the present study we have used ECs and SMCs. These vascular cells are known to play a wide variety of critical roles in the control of vascular function, among them, the regulation of blood coagulation through unrelated membrane-associated receptors for blood coagulation proteases including TF, TM, TFPI or EPCR²³⁻²⁹.

Our finding that spiking a FVIII-deficient plasma with Emicizumab and aPCC led to a hyper generation of thrombin in a TG model where either AECs or VSMCs are present indicate that the association of these two therapies is not as well as FVIIIa-FIXa complex controlled by the anticoagulation system. Emicizumab-FIXa and FVIIIa-FIXa complexes have in common that FIXa is sensitive to inhibition by natural anticoagulants^{30,31}. However, the tenase complex has a second mechanism of control, in which FVIIIa cofactor activity is counterbalanced through a proteolytic degradation by activated protein C, as recently supported by an in vivo study³². Because tenase activity is limited by its cofactor activity, FVIIIa inactivation is an important process to control FXa generation as illustrated by the observations that a decreased protein C sensitivity of FVIII is associated with increased FVIII activity and a prothrombotic phenotype^{33,34}. Moreover, the thrombosis risk detected with high FVIII activity was tempered when normalized for activated protein C sensitivity³⁵. Emicizumab-FIXa complex activity does not benefit of the protein C system of regulation.

Our results with rFVIIa are in agreement with the safety profile of this therapy observed in HAVEN clinical studies³⁶ and in previous in vitro studies studying the TG induced by rFVIIa in combination with Emicizumab on FVIII-deficient plasma^{13,37}. We found that addition of rFVIIa to Emicizumab moderately increased thrombin peak and reduced time to thrombin peak compared to Emicizumab alone. Interestingly, this combination increased considerably thrombin peak compared to rFVIIa alone on resting AECs but not on stimulated AECs or VSMCs. Furthermore, the intensity and the speed of TG induced by rFVIIa is different on the type of vascular cells. TG is much faster and intense on VSMCs compared to AECs, and faster but slightly less intense on stimulated AECs compared to resting AECs. The extent of the modulators of the coagulation displayed by these different cells probably explains these results. However, none of the conditions tested in our study led to an overproduction of thrombin which would have represented a thrombotic risk. A limitation of our study is the evaluation of TG parameters in platelet poor plasma (PPP) and not in platelet-rich plasma (PRP) for practical and technical reasons. Indeed, it has been suspected that

rFVIIa also functions by a mechanism independent of TF on platelets and provokes a more severe TG increase in PRP than PPP^{38,39}. However, a weaker coagulant response of rFVIIa than of aPCC was also observed in thromboelastometry¹². Altogether, our results are consistent with the absence of associated safety issues observed in the HAVEN clinical program³⁶.

We observed that the addition of FVIII to FVIII-deficient plasma with Emicizumab moderately increased thrombin peak on VSMCs, to a more important extent on resting AECs, and even more on stimulated AECs. However, the extent of TG observed when FVIII was combined to Emicizumab did not result of excess TG and was very similar to TG observed with FVIII alone at all doses tested (50 to 150 U/dL). One possible explanation is the stronger affinity of FVIII for FIXa and FX than Emicizumab which would lead to an absence of additive effect of the two therapies. Importantly, our results are consistent with the absence of safety issues associated with co-exposure of FVIII with Emicizumab observed in the HAVEN 3 clinical trial⁴⁰.

Potential limitations of the study include the in vitro nature of the TG assay, the addition of therapeutic molecules to FVIII-immunodepleted plasma, or the absence of flow in our approach. Caution must be employed when extrapolating data to clinical characteristics observed.

Our findings, taking into account the vascular space and in particular the endothelium demonstrates that the presence of coagulation modulators provided by vascular cells does not avoid an excessive generation of thrombin, known to be a thrombotic risk, when aPCC is combined with Emicizumab in FVIII-deficient plasma. This synergistic effect or excess of thrombin generation was not observed for FVIII or rFVIIa addition to Emicizumab. This study confirms that caution should be exercised when administering aPCC to patients treated with emicizumab. The safety of aPCC infusion at a low dose in patients treated with HA with inhibitors need to be assess by clinical trials.

Funding: This study received funding from

Acknowledgements: The authors thank

Conflict of interest: XXXX . The other authors declare no conflict of interest.

References

1. Mannucci, P M, and E G Tuddenham. "The hemophilias--from royal genes to gene therapy." *The New England journal of medicine* vol. 344,23 (2001): 1773-9. doi:10.1056/NEJM200106073442307
2. Franchini, Massimo, and Pier Mannuccio Mannucci. "Hemophilia A in the third millennium." *Blood reviews* vol. 27,4 (2013): 179-84. doi:10.1016/j.blre.2013.06.002
3. Srivastava, Alok et al. "WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition." *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* vol. 26 Suppl 6 (2020): 1-158. doi:10.1111/hae.14046
4. Schep, S J et al. "Review of immune tolerance induction in hemophilia A." *Blood reviews* vol. 32,4 (2018): 326-338. doi:10.1016/j.blre.2018.02.003
5. Ewing, N et al. "Prophylaxis with FEIBA in paediatric patients with haemophilia A and inhibitors." *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* vol. 21,3 (2015): 358-364. doi:10.1111/hae.12602
6. Ju, Hee Young et al. "The efficacy of bypassing agents in surgery of hemophilia patients with inhibitors." *Blood research* vol. 50,3 (2015): 173-8. doi:10.5045/br.2015.50.3.173
7. Shima, Midori et al. "Factor VIII-Mimetic Function of Humanized Bispecific Antibody in Hemophilia A." *The New England journal of medicine* vol. 374,21 (2016): 2044-53. doi:10.1056/NEJMoa1511769
8. Kitazawa, Takehisa et al. "A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model." *Nature medicine* vol. 18,10 (2012): 1570-4. doi:10.1038/nm.2942
9. Oldenburg, Johannes et al. "Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors." *The New England journal of medicine* vol. 377,9 (2017): 809-818. doi:10.1056/NEJMoa1703068
10. Lenting, Peter J et al. "Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII?." *Blood* vol. 130,23 (2017): 2463-2468. doi:10.1182/blood-2017-08-801662
11. Zong, Yanan et al. "Synergistic Effect of Bypassing Agents and Sequence Identical Analogue of Emicizumab and Fibrin Clot Structure in the In Vitro Model of Hemophilia A." *TH open : companion journal to thrombosis and haemostasis* vol. 4,2 e94-e103. 21 Jul. 2020, doi:10.1055/s-0040-1710032
12. Schultz, Nina Haagenrud et al. "The effect of emicizumab and bypassing agents in patients with hemophilia - An in vitro study." *Research and practice in thrombosis and haemostasis* vol. 5,5 e12561. 27 Jun. 2021, doi:10.1002/rth2.12561
13. Hartmann, R et al. "In vitro studies show synergistic effects of a procoagulant bispecific antibody and bypassing agents." *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 10.1111/jth.14203. 11 Jun. 2018, doi:10.1111/jth.14203
14. Kizilocak, Hande et al. "Comparison of bypassing agents in patients on emicizumab using global hemostasis assays." *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* vol. 27,1 (2021): 164-172. doi:10.1111/hae.14213
15. Watson, Steve P. "Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis." *Current pharmaceutical design* vol. 15,12 (2009): 1358-72. doi:10.2174/138161209787846702
16. Ait Aissa, Karima et al. "Vascular smooth muscle cells are responsible for a prothrombotic phenotype of spontaneously hypertensive rat arteries." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* vol. 35,4 (2015): 930-7. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305377
17. Castaman, Giancarlo et al. "Emergency management in patients with haemophilia A and inhibitors on prophylaxis with emicizumab: AICE practical guidance in collaboration with SIBioC, SIMEU, SIMEUP, SIPMeL and SISET." *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* vol. 18,2 (2020): 143-151. doi:10.2450/2019.0186-19
18. Susen, Sophie et al. "Management of bleeding and invasive procedures in haemophilia A patients with inhibitor treated with emicizumab (Hemlibra®): Proposals from the

- French network on inherited bleeding disorders (MHEMO), the French Reference Centre on Haemophilia, in collaboration with the French Working Group on Perioperative Haemostasis (GIHP).” *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* vol. 25,5 (2019): 731-737. doi:10.1111/hae.13817
19. Collins, P W et al. “Treatment of bleeding episodes in haemophilia A complicated by a factor VIII inhibitor in patients receiving Emicizumab. Interim guidance from UKHCDO Inhibitor Working Party and Executive Committee.” *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* vol. 24,3 (2018): 344-347. doi:10.1111/hae.13495
 20. Kitazawa, Takehisa et al. “Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens.” *Thrombosis and haemostasis* vol. 117,7 (2017): 1348-1357. doi:10.1160/TH17-01-0030
 21. Elödi, S, and K Váradi. “Activation of clotting factors in prothrombin complex concentrates as demonstrated by clotting assays for factors IXa and Xa.” *Thrombosis research* vol. 12,5 (1978): 797-807. doi:10.1016/0049-3848(78)90274-8
 22. Hultin, M B. “Activated clotting factors in factor IX concentrates.” *Blood* vol. 54,5 (1979): 1028-38.
 23. Pearson, J D. “Endothelial cell function and thrombosis.” *Bailliere's best practice & research. Clinical haematology* vol. 12,3 (1999): 329-41. doi:10.1053/beh.1999.0028
 24. Bajaj, M S et al. “Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor.” *Thrombosis and haemostasis* vol. 86,4 (2001): 959-72.
 25. Esmon, C T. “Inflammation and thrombosis.” *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* vol. 1,7 (2003): 1343-8. doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00261.x
 26. Schecter, A D et al. “Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation.” *The Journal of clinical investigation* vol. 100,9 (1997): 2276-85. doi:10.1172/JCI119765
 27. Soff, G A et al. “Expression of thrombomodulin by smooth muscle cells in culture: different effects of tumor necrosis factor and cyclic adenosine monophosphate on thrombomodulin expression by endothelial cells and smooth muscle cells in culture.” *Blood* vol. 77,3 (1991): 515-8.
 28. Caplice, N M et al. “Expression of tissue factor pathway inhibitor in vascular smooth muscle cells and its regulation by growth factors.” *Circulation research* vol. 83,12 (1998): 1264-70. doi:10.1161/01.res.83.12.1264
 29. Bretschneider, Ellen et al. “Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor.” *Circulation research* vol. 100,2 (2007): 255-62. doi:10.1161/01.RES.0000255685.06922.c7
 30. Rosenberg, J S et al. “Inhibition of human factor IXa by human antithrombin.” *The Journal of biological chemistry* vol. 250,23 (1975): 8883-8.
 31. Schmaier, A H et al. “Protease nexin-2/amyloid beta protein precursor. A tight-binding inhibitor of coagulation factor IXa.” *The Journal of clinical investigation* vol. 92,5 (1993): 2540-5. doi:10.1172/JCI116863
 32. Wilhelm, Amelia R et al. “Activated protein C has a regulatory role in factor VIII function.” *Blood* vol. 137,18 (2021): 2532-2543. doi:10.1182/blood.2020007562
 33. Laffan, M A, and R Manning. “The influence of factor VIII on measurement of activated protein C resistance.” *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* vol. 7,8 (1996): 761-5. doi:10.1097/00001721-199611000-00003
 34. de Visser, M C et al. “A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis.” *Blood* vol. 93,4 (1999): 1271-6.
 35. Henkens, C M et al. “Lowered APC-sensitivity ratio related to increased factor VIII-clotting activity.” *Thrombosis and haemostasis* vol. 74,4 (1995): 1198-9.
 36. Levy, Gallia G et al. “Safety analysis of rFVIIa with emicizumab dosing in congenital hemophilia A with inhibitors: Experience from the HAVEN clinical program.” *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* vol. 17,9 (2019): 1470-1477. doi:10.1111/jth.14491

37. Grandoni, Jerry et al. "Exploratory in vitro evaluation of thrombin generation of eptacog beta (recombinant human fvii) and emicizumab in congenital haemophilia A plasma." *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* vol. 27,2 (2021): 321-328. doi:10.1111/hae.14253
38. Augustsson, Cecilia, and Egon Persson. "In vitro evidence of a tissue factor-independent mode of action of recombinant factor VIIa in hemophilia." *Blood* vol. 124,20 (2014): 3172-4. doi:10.1182/blood-2014-05-576892
39. Gerotziakas, Grigoris T et al. "The role of platelets and recombinant factor VIIa on thrombin generation, platelet activation and clot formation." *Thrombosis and haemostasis* vol. 91,5 (2004): 977-85. doi:10.1160/TH03-10-0638
40. Mahlangu, Johnny et al. "Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors." *The New England journal of medicine* vol. 379,9 (2018): 811-822. doi:10.1056/NEJMoa1803550

Tables

Table 1 : Concentrations of the therapeutic agents, FVIII and the Bypassing agents Emicizumab, aPCC, and FVIIa for in vitro spiking and approximate clinical doses (*).

Therapy	Concentration for in vitro spiking					
Emicizumab (µg/mL)	0	50				
(mg/kg)*	0	3				
FVIII (U/dL)	0	10	25	50	100	150
(mg/kg)*	0	5	12.5	25	50	75
FVIIa (µg/mL)	0	1	2.5	5		
(µg/kg)*	0	60	150	300		
aPCC (IU/mL)	0	1	2	4		
(U/kg)*	0	100	200	400		

Table 2 : Summary of TG parameters in FVIII deficient plasma spiked with FVIII ± Emicizumab. Mean and standard deviation (SD) of values for Lag time, peak height, Endogenous Thrombin Potential, and time to peak are shown. ND: not determined.

FVIII and Emicizumab concentrations	VSMCs	AECs	
		unstimulated	+ TNF-alpha
Lag time, min			
FVIII deficient plasma	11.6 ± 0.2 (n=3)	30.2 ± 23.7 (n=4)	26.4 ± 5.0 (n=4)
+ Emicizumab (50µg/mL)	12.8 ± 0.2 (n=6)	26.8 ± 8.8 (n=6)	21.6 ± 5.1 (n=6)
+ FVIII (10U/dL)	ND	15.6 ± 3.4 (n=6)	15.5 ± 1.8 (n=6)
+ FVIII (25U/dL)	12.0 ± 0.1 (n=3)	15.2 ± 3.9 (n=6)	13.8 ± 1.2 (n=6)
+ FVIII (50U/dL)	12.0 ± 0.1 (n=3)	13.8 ± 2.4 (n=6)	14.6 ± 1.4 (n=6)
+ FVIII (100U/dL)	10.2 ± 0.5 (n=3)	12.0 ± 1.6 (n=6)	13.1 ± 1.4 (n=6)
+ FVIII (150U/dL)	10.6 ± 0.2 (n=3)	10.2 ± 1.5 (n=6)	10.8 ± 1.6 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (50U/dL)	13.0 ± 0.6 (n=3)	14.3 ± 3.0 (n=6)	12.3 ± 0.8 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (100U/dL)	11.9 ± 0.8 (n=3)	13.8 ± 3.2 (n=6)	13.1 ± 0.8 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (150U/dL)	12.9 ± 0.2 (n=3)	12.9 ± 2.9 (n=6)	12.4 ± 1.4 (n=6)
Peak height, nM			
FVIII deficient plasma	26.0 ± 0.9 (n=3)	0.8 ± 0.4 (n=6)	2.7 ± 1.0 (n=4)
+ Emicizumab (50µg/mL)	32.2 ± 1.4 (n=6)	15.2 ± 6.0 (n=6)	5.3 ± 1.2 (n=6)
+ FVIII (10U/dL)	ND	36.7 ± 10.0 (n=6)	16.2 ± 1.0 (n=6)
+ FVIII (25U/dL)	45.3 ± 1.5 (n=3)	42.4 ± 9.5 (n=6)	20.2 ± 3.4 (n=6)
+ FVIII (50U/dL)	50.0 ± 0.9 (n=3)	49.4 ± 7.9 (n=6)	22.8 ± 3.9 (n=6)
+ FVIII (100U/dL)	57.2 ± 3.0 (n=3)	58.1 ± 16.2 (n=6)	29.6 ± 4.1 (n=6)
+ FVIII (150U/dL)	61.0 ± 1.1 (n=3)	93.3 ± 7.9 (n=6)	62.2 ± 23.3 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (50U/dL)	47.3 ± 1.1 (n=3)	50.3 ± 8.1 (n=6)	21.4 ± 2.6 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (100U/dL)	53.3 ± 1.7 (n=3)	57.3 ± 7.9 (n=6)	26.8 ± 2.6 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (150U/dL)	58.7 ± 0.8 (n=3)	65.7 ± 13.1 (n=6)	35.7 ± 7.1 (n=6)
Endogenous Thrombin Potential, nM.min			
FVIII deficient plasma	768.0 ± 69.5 (n=3)	34.8 ± 8.5 (n=6)	119.5 ± 44.9 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL)	900.0 ± 38.1 (n=6)	685.5 ± 195.1 (n=6)	261.7 ± 59.0 (n=6)
+ FVIII (10U/dL)	ND	928.8 ± 226.8 (n=6)	499.3 ± 35.0 (n=6)
+ FVIII (25U/dL)	1079.0 ± 65.1 (n=3)	1021.7 ± 191.3 (n=6)	573.7 ± 70.7 (n=6)
+ FVIII (50U/dL)	1196.7 ± 58.2 (n=3)	1015.0 ± 99.3 (n=6)	609.5 ± 95.0 (n=6)
+ FVIII (100U/dL)	1179.0 ± 65.2 (n=3)	1085.3 ± 187.3 (n=6)	720.5 ± 145.1 (n=6)
+ FVIII (150U/dL)	1287.0 ± 54.7 (n=3)	1475.2 ± 111.6 (n=6)	1166.3 ± 247.0 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (50U/dL)	1053.0 ± 25.0 (n=3)	1366.7 ± 223.9 (n=6)	649.3 ± 142.7 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (100U/dL)	1163.7 ± 44.1 (n=3)	1354.7 ± 217.1 (n=6)	713.2 ± 74.1 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (150U/dL)	1224.7 ± 52.0 (n=3)	1418.8 ± 263.0 (n=6)	943.5 ± 213.5 (n=6)
Time to Peak, min			
FVIII deficient plasma	25.9 ± 0.5 (n=3)	56.6 ± 42.8 (n=6)	51.9 ± 3.2 (n=4)
+ Emicizumab (50µg/mL)	27.4 ± 0.5 (n=3)	48.1 ± 12.8 (n=6)	43.2 ± 6.8 (n=6)
+ FVIII (10U/dL)	ND	27.6 ± 4.7 (n=6)	31.8 ± 0.8 (n=6)
+ FVIII (25U/dL)	23.4 ± 0.2 (n=3)	25.6 ± 4.9 (n=6)	28.2 ± 1.3 (n=6)
+ FVIII (50U/dL)	22.2 ± 0.2 (n=3)	23.1 ± 3.4 (n=6)	27.1 ± 2.0 (n=6)
+ FVIII (100U/dL)	19.7 ± 0.3 (n=3)	21.0 ± 3.6 (n=6)	24.3 ± 1.5 (n=6)
+ FVIII (150U/dL)	19.4 ± 0.2 (n=3)	16.3 ± 1.8 (n=6)	18.8 ± 3.6 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (50U/dL)	23.7 ± 0.3 (n=3)	23.8 ± 3.9 (n=6)	26.4 ± 0.5 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (100U/dL)	21.2 ± 1.1 (n=3)	22.3 ± 4.1 (n=6)	24.3 ± 0.7 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIII (150U/dL)	22.0 ± 0.3 (n=3)	21.1 ± 4.0 (n=6)	23.2 ± 1.4 (n=6)

Table 3 : Summary of TG parameters in FVIII deficient plasma spiked with FVIIa ± Emicizumab. Mean and standard deviation (SD) of values for Lag time, peak height, Endogenous Thrombin Potential, and time to peak are shown. ND: not determined.

FVIIa and Emicizumab concentrations	VSMCs	AECs	
		unstimulated	+ TNF-alpha
Lag time, min			
FVIII deficient plasma	11.6 ± 0.2 (n=3)	30.2 ± 23.7 (n=4)	26.4 ± 5.0 (n=4)
+ Emicizumab (50µg/mL)	12.8 ± 0.2 (n=6)	26.8 ± 8.8 (n=6)	21.6 ± 5.1 (n=6)
+ FVIIa (1µg/mL)	11.7 ± 0.1 (n=3)	58.3 ± 10.1 (n=4)	14.6 ± 2.1 (n=6)
+ FVIIa (2.5µg/mL)	11.6 ± 0.5 (n=3)	46.0 ± 12.5 (n=6)	13.7 ± 2.7 (n=6)
+ FVIIa (5.0µg/mL)	11.4 ± 0.5 (n=3)	31.7 ± 6.8 (n=6)	13.6 ± 2.7 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (1µg/mL)	11.6 ± 1.1 (n=3)	21.5 ± 5.2 (n=4)	14.7 ± 1.9 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (2.5µg/mL)	12.2 ± 0.2 (n=3)	17.9 ± 2.8 (n=6)	12.2 ± 1.6 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (5.0µg/mL)	12.2 ± 0.5 (n=3)	16.9 ± 2.9 (n=6)	12.8 ± 1.6 (n=6)
Peak height, nM			
FVIII deficient plasma	26.0 ± 0.9 (n=3)	0.8 ± 0.4 (n=6)	2.7 ± 1.0 (n=4)
+ Emicizumab (50µg/mL)	32.2 ± 1.4 (n=6)	15.2 ± 6.0 (n=6)	5.3 ± 1.2 (n=6)
+ FVIIa (1µg/mL)	36.7 ± 2.4 (n=3)	0.8 ± 0.5 (n=6)	3.8 ± 0.4 (n=6)
+ FVIIa (2.5µg/mL)	39.6 ± 1.0 (n=3)	1.4 ± 0.2 (n=6)	5.1 ± 0.6 (n=6)
+ FVIIa (5.0µg/mL)	42.2 ± 1.5 (n=3)	2.9 ± 1.0 (n=6)	6.2 ± 1.5 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (1µg/mL)	38.3 ± 0.3 (n=3)	16.1 ± 4.1 (n=6)	6.3 ± 0.5 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (2.5µg/mL)	42.8 ± 3.1 (n=3)	19.6 ± 5.3 (n=6)	8.2 ± 0.6 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (5.0µg/mL)	47.2 ± 0.9 (n=3)	25.2 ± 3.6 (n=6)	12.9 ± 1.5 (n=6)
Endogenous Thrombin Potential, nM.min			
FVIII deficient plasma	768.0 ± 69.5 (n=3)	34.8 ± 8.5 (n=6)	119.5 ± 44.9 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL)	900.0 ± 38.1 (n=6)	685.5 ± 195.1 (n=6)	261.7 ± 59.0 (n=6)
+ FVIIa (1µg/mL)	1021.3 ± 95.4 (n=3)	29.2 ± 17.1 (n=6)	151.7 ± 9.5 (n=6)
+ FVIIa (2.5µg/mL)	1138.3 ± 13.2 (n=3)	90.3 ± 26.9 (n=6)	223.8 ± 43.5 (n=6)
+ FVIIa (5.0µg/mL)	1082.3 ± 19.4 (n=3)	112.7 ± 25.4 (n=6)	279.0 ± 95.5 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (1µg/mL)	1087.0 ± 37.6 (n=3)	756.5 ± 120.3 (n=6)	302.7 ± 26.7 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (2.5µg/mL)	1102.7 ± 97.4 (n=3)	784.7 ± 96.0 (n=6)	382.8 ± 79.2 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (5.0µg/mL)	1247.7 ± 83.8 (n=3)	1035.2 ± 73.0 (n=6)	622.2 ± 151.3 (n=6)
Time to Peak, min			
FVIII deficient plasma	25.9 ± 0.5 (n=3)	56.6 ± 42.8 (n=6)	51.9 ± 3.2 (n=4)
+ Emicizumab (50µg/mL)	27.4 ± 0.5 (n=3)	48.1 ± 12.8 (n=6)	43.2 ± 6.8 (n=6)
+ FVIIa (1µg/mL)	25.3 ± 0.6 (n=3)	84.3 ± 20.8 (n=6)	37.3 ± 3.0 (n=6)
+ FVIIa (2.5µg/mL)	24.8 ± 0.4 (n=3)	63.7 ± 10.4 (n=6)	36.1 ± 2.9 (n=6)
+ FVIIa (5.0µg/mL)	23.8 ± 0.2 (n=3)	50.7 ± 1.2 (n=3)	34.1 ± 1.9 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (1µg/mL)	25.0 ± 1.0 (n=3)	41.8 ± 7.9 (n=6)	37.9 ± 2.1 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (2.5µg/mL)	24.7 ± 0.3 (n=3)	36.7 ± 5.7 (n=6)	32.9 ± 3.1 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + FVIIa (5.0µg/mL)	24.1 ± 0.7 (n=3)	34.7 ± 4.5 (n=6)	32.7 ± 1.2 (n=6)

Table 4 : Summary of TG parameters in FVIII deficient plasma spiked with aPCC ± Emicizumab. Mean and standard deviation (SD) of values for Lag time, peak height, Endogenous Thrombin Potential, and time to peak are shown. ND: not determined.

aPCC and Emicizumab concentrations	VSMCs	AECs	
		unstimulated	+ TNF-alpha
Lag time, min			
FVIII deficient plasma	11.6 ± 0.2 (n=3)	30.2 ± 23.7 (n=4)	26.4 ± 5.0 (n=4)
+ Emicizumab (50µg/mL)	12.8 ± 0.2 (n=6)	26.8 ± 8.8 (n=6)	21.6 ± 5.1 (n=6)
+ aPCC (1 U/mL)	12.3 ± 0.3 (n=3)	18.8 ± 2.3 (n=6)	12.4 ± 1.0 (n=6)
+ aPCC (2 U/mL)	12.6 ± 0.2 (n=3)	15.2 ± 2.1 (n=6)	10.8 ± 0.3 (n=6)
+ aPCC (4 U/mL)	11.9 ± 0.8 (n=3)	12.2 ± 1.0 (n=6)	9.8 ± 0.3 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (1 U/mL)	7.8 ± 0.2 (n=3)	7.0 ± 0.6 (n=6)	6.2 ± 0.2 (n=4)
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (2 U/mL)	7.2 ± 0.3 (n=3)	6.0 ± 0.4 (n=6)	5.5 ± 0.2 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (4 U/mL)	6.6 ± 0.3 (n=3)	NA	NA
Peak height, nM			
FVIII deficient plasma	26.0 ± 0.9 (n=3)	0.8 ± 0.4 (n=6)	2.7 ± 1.0 (n=4)
+ Emicizumab (50µg/mL)	32.2 ± 1.4 (n=6)	15.2 ± 6.0 (n=6)	5.3 ± 1.2 (n=6)
+ aPCC (1 U/mL)	30.9 ± 2.4 (n=3)	13.9 ± 0.5 (n=6)	25.2 ± 2.5 (n=6)
+ aPCC (2 U/mL)	42.1 ± 0.6 (n=3)	26.3 ± 2.2 (n=6)	41.6 ± 3.5 (n=6)
+ aPCC (4 U/mL)	56.3 ± 5.9 (n=3)	38.3 ± 5.8 (n=6)	55.9 ± 4.5 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (1 U/mL)	151.1 ± 2.2 (n=3)	121.3 ± 11.5 (n=6)	127.6 ± 3.5 (n=5)
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (2 U/mL)	256.8 ± 5.5 (n=3)	255.5 ± 14.8 (n=6)	356.6 ± 50.5 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (4 U/mL)	ND	ND	621.9 (n=1)
Endogenous Thrombin Potential, nM.min			
FVIII deficient plasma	768.0 ± 69.5 (n=3)	34.8 ± 8.5 (n=6)	119.5 ± 44.9 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL)	900.0 ± 38.1 (n=6)	685.5 ± 195.1 (n=6)	261.7 ± 59.0 (n=6)
+ aPCC (1 U/mL)	845.3 ± 70.4 (n=3)	575.0 ± 35.6 (n=6)	794.2 ± 108.2 (n=6)
+ aPCC (2 U/mL)	ND	852.7 ± 144.9 (n=6)	1375.5 ± 236.4 (n=6)
+ aPCC (4 U/mL)	ND	ND	1788.0 ± 234.3 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (1 U/mL)	2622.8 ± 38.7 (n=3)	2086.5 ± 331.7 (n=6)	2703.5 ± 134.6 (n=3)
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (2 U/mL)	ND	ND	ND
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (4 U/mL)	ND	ND	ND
Time to peak, min			
FVIII deficient plasma	25.9 ± 0.5 (n=3)	56.6 ± 42.8 (n=6)	51.9 ± 3.2 (n=4)
+ Emicizumab (50µg/mL)	27.4 ± 0.5 (n=3)	48.1 ± 12.8 (n=6)	43.2 ± 6.8 (n=6)
+ aPCC (1 U/mL)	26.8 ± 0.2 (n=3)	35.8 ± 3.9 (n=6)	26.9 ± 1.1 (n=6)
+ aPCC (2 U/mL)	26.0 ± 0.3 (n=3)	29.9 ± 2.6 (n=6)	23.8 ± 0.4 (n=6)
+ aPCC (4 U/mL)	23.1 ± 1.5 (n=3)	25.1 ± 0.8 (n=6)	20.8 ± 0.8 (n=6)
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (1 U/mL)	15.0 ± 3.5 (n=3)	12.3 ± 0.5 (n=6)	11.9 ± 0.6 (n=4)
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (2 U/mL)	19.7 ± 0.7 (n=3)	19.8 ± 1.0 (n=6)	ND
+ Emicizumab (50µg/mL) + aPCC (4 U/mL)	ND	ND	ND

Figure legends

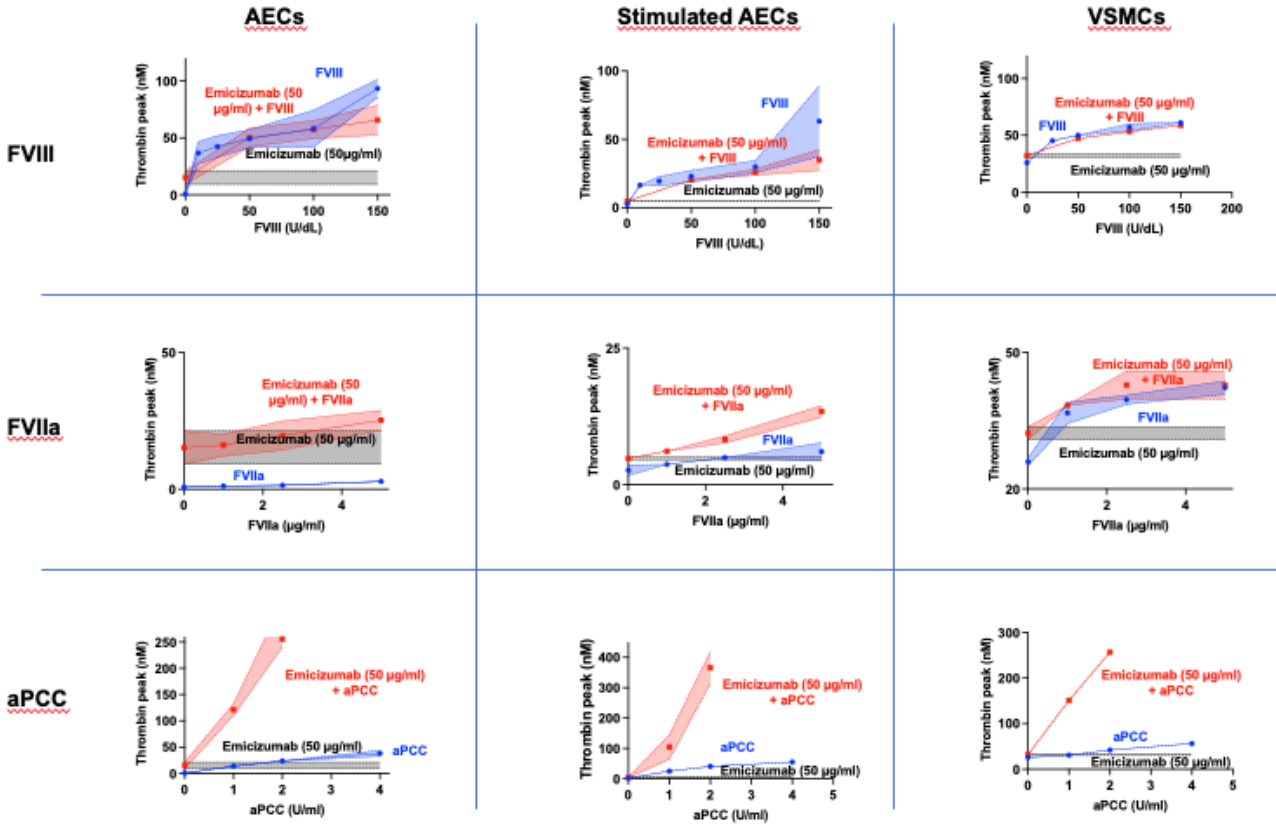


Figure 1 : Mean peak thrombin levels during thrombin generation in FVIII deficient plasma spiked with Emicizumab combined with either FVIII or FVIIa or aPCC on Aortic Endothelial Cells (AECs), TNF-alpha stimulated AECs, and Human Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs). Column on the left, mean peak thrombin levels on AECs. Column in the middle, mean peak thrombin levels on TNF-alpha stimulated AECs. Column in the right, mean peak thrombin levels on VSMCs. Row on top, mean peak thrombin levels for Emicizumab (black), FVIII (blue), and Emicizumab:FVIII combination (red) where FVIII deficient plasma was spiked with FVIII at different concentrations ; Row in the middle, mean peak thrombin levels for Emicizumab (black), FVIIa (blue), and Emicizumab-FVIIa combination (red) where FVIII deficient plasma was spiked with FVIIa at different concentrations ; Row at the bottom, mean peak thrombin levels for Emicizumab (black), aPCC (blue), and Emicizumab-aPCC combination (red) where FVIII deficient plasma was spiked with aPCC at different concentrations.

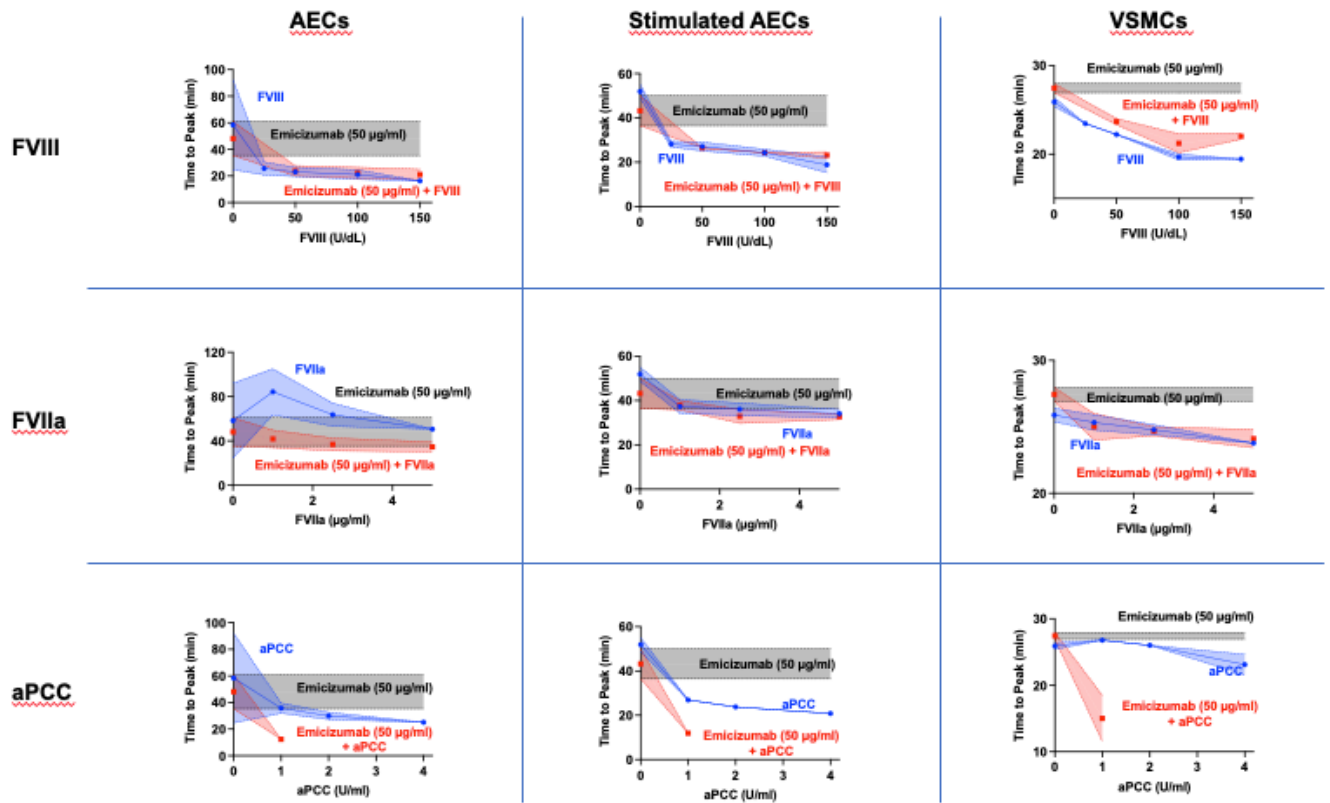


Figure 2 : Mean time to Peak levels during thrombin generation in FVIII deficient plasma spiked with Emicizumab combined with either FVIII or FVIIa or aPCC on Aortic Endothelial Cells (AECs), TNF-alpha stimulated AECs, and Human Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs). Column on the left, mean time to Peak levels on AECs. Column in the middle, mean peak thrombin levels on TNF-alpha stimulated AECs. Column in the right, mean time to Peak levels on VSMCs. Row on top, mean time to Peak levels for Emicizumab (black), FVIII (blue), and Emicizumab:+FVIII combination (red) where FVIII deficient plasma was spiked with FVIII at different concentrations ; Row in the middle, mean time to Peak levels for Emicizumab (black), FVIIa (blue), and Emicizumab-FVIIa combination (red) where FVIII deficient plasma was spiked with FVIIa at different concentrations ; Row at the bottom, mean time to Peak levels for Emicizumab (black), aPCC (blue), and Emicizumab-aPCC combination (red) where FVIII deficient plasma was spiked with aPCC at different concentrations.

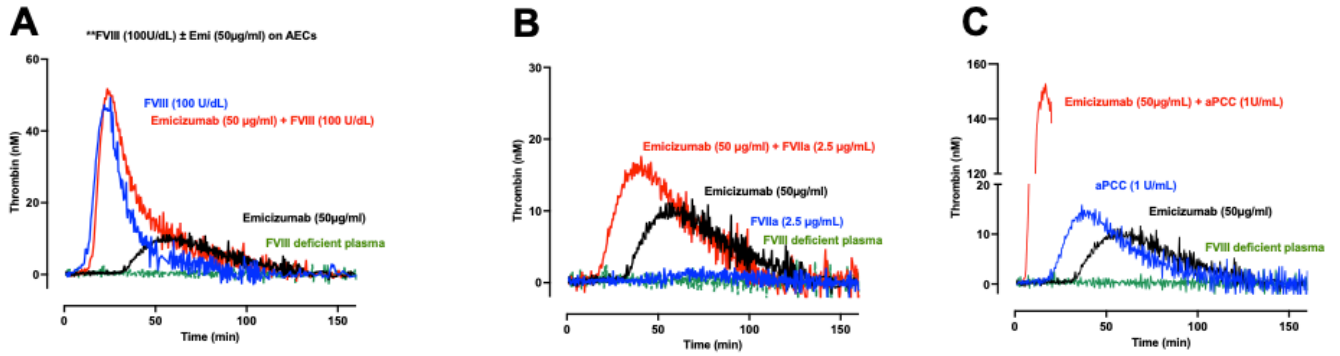


Figure 3 : Representatives thrombin generation curves obtained with FVIII deficient plasma spiked with Emicizumab combined (red) or not (black) with either FVIII (A) or FVIIa (B) or aPCC (C), all at a therapeutic dose, on Human Aortic Endothelial Cells (AECs).

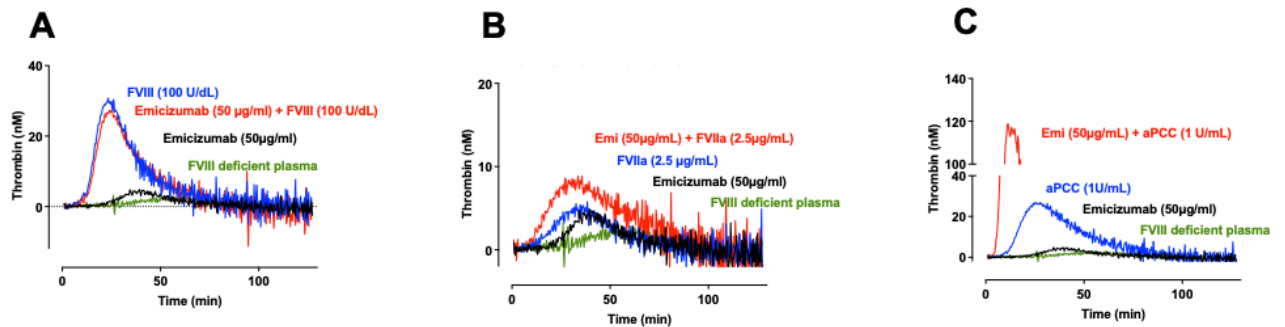


Figure 4 : Representatives thrombin generation curves obtained with FVIII deficient plasma spiked with Emicizumab combined (red) or not (black) with either FVIII (A) or FVIIa (B) or aPCC (C), all at a therapeutic dose, on stimulated TNF-alpha Human Aortic Endothelial Cells (stimulated-AECs).

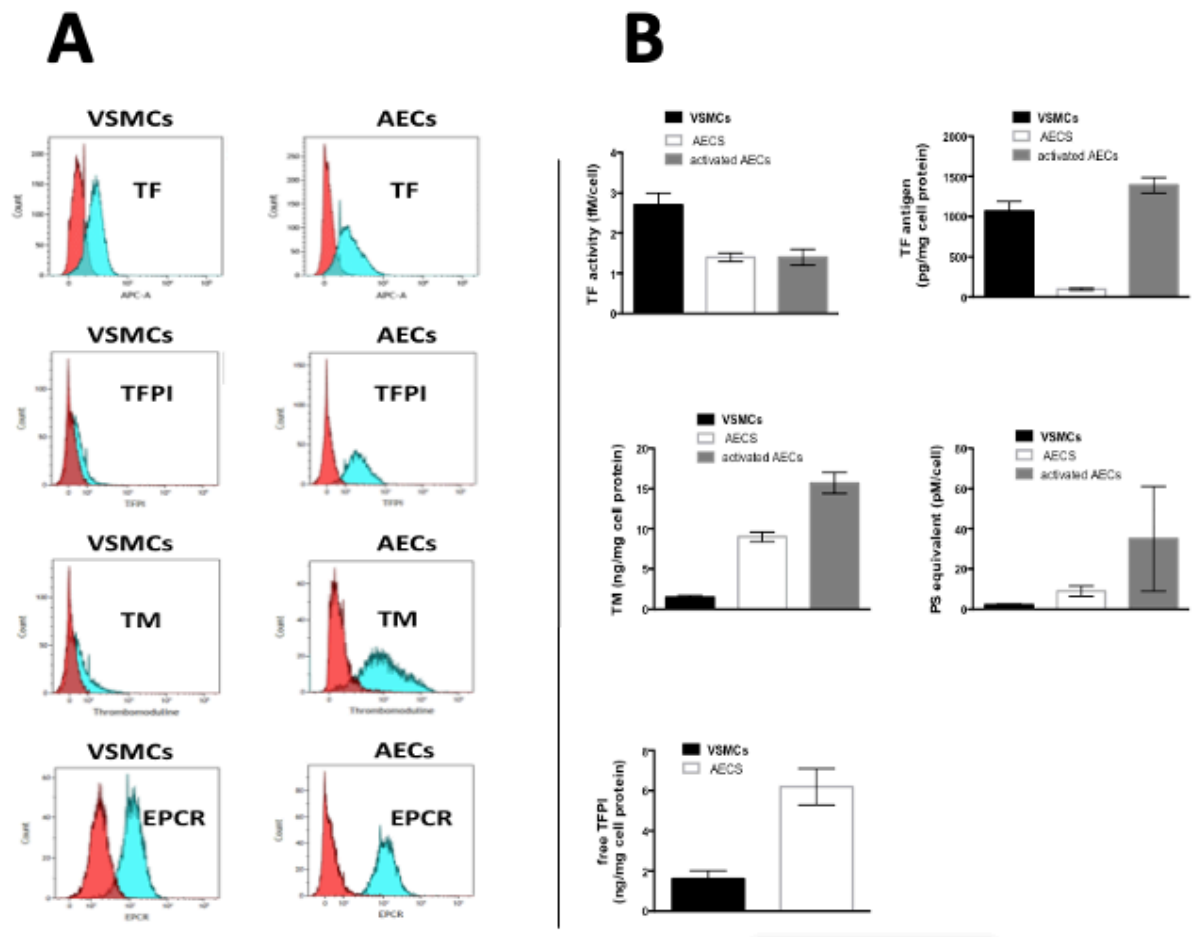


Figure 5 : Quantification of modulators of TG on vascular cells. A) Cell surface expression of EPCR, TF, TFPI, and TM was determined by flow cytometry as described in Material and Methods in parallel to the TG experiments. Human cells were stained with either BD Horizon BV510 Rat Anti-Human CD201 antibody (EPCR), Mouse anti-Human TF IgG1 antibody (TF9-1010; Allophycyanin), BD Horizon BV421 Mouse anti-Human CD41 IgG1 antibody (TM) or Santa Cruz Mouse anti-Human TFPI IgG1 antibody (sc-365920 PE).

B) Representative histograms of concentrations or activities of TF, free TFPI, PS, and TM on vascular cells, SMCs, AECs and stimulated AECs. Data in all panels of this figure are either representative or the average \pm SD of at least 3 independent experiments.

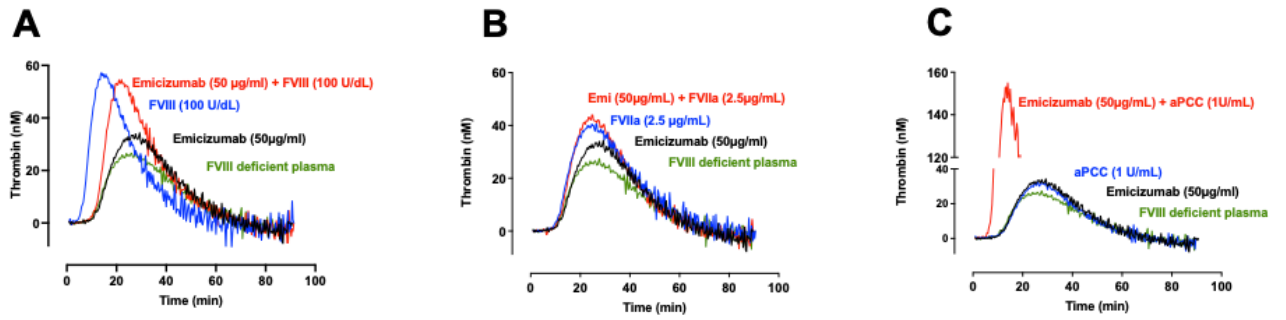


Figure 6 : Representatives thrombin generation curves obtained with FVIII deficient plasma spiked with Emicizumab combined (red) or not (black) with either FVIII (A) or FVIIa (B) or aPCC (C), all at a therapeutic dose, on Human Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs).

PARTIE 7 : BIBLIOGRAPHIE

1. Kaptoge, S. *et al.* World Health Organization cardiovascular disease risk charts: revised models to estimate risk in 21 global regions. *The Lancet Global Health* **7**, e1332–e1345 (2019).
2. Zhou, M. *et al.* Aging and Cardiovascular Disease: Current Status and Challenges. *Reviews in Cardiovascular Medicine* **23**, 135 (2022).
3. Rivière, S. Risque cardiovasculaire et maladies inflammatoires chroniques. *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux-Pratique* **2021**, 3–6 (2021).
4. Kostopoulou, M., Nikolopoulos, D., Parodis, I. & Bertias, G. Cardiovascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus: Recent Data on Epidemiology, Risk Factors and Prevention. *Current Vascular Pharmacology* **18**, 549–565.
5. England, B. R., Thiele, G. M., Anderson, D. R. & Mikuls, T. R. Increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: mechanisms and implications. *BMJ* k1036 (2018) doi:10.1136/bmj.k1036.
6. de Groot, P. G. & de Laat, B. Mechanisms of thrombosis in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **31**, 334–341 (2017).
7. Marnett, A., Barcellona, D. & Marongiu, F. Rheumatoid arthritis and thrombosis. *Clin Exp Rheumatol* **27**, 846–855 (2009).
8. Nuñez, P., García Mateo, S., Quera, R. & Gomollón, F. Inflammatory bowel disease and the risk of cardiovascular diseases. *Gastroenterol Hepatol* **44**, 236–242 (2021).
9. Romo, G. M. *et al.* The Glycoprotein Ib-IX-V Complex Is a Platelet Counterreceptor for P-Selectin. *J Exp Med* **190**, 803–814 (1999).
10. Bennett, J. S. Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. *J Clin Invest* **115**, 3363–3369 (2005).
11. Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* **23**, 177–189 (2009).
12. Bonnefoy, A. *et al.* Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting (sub)endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13. *Blood* **107**, 955–964 (2006).
13. Furie, B. & Furie, B. C. Mechanisms of Thrombus Formation. *N Engl J Med* **359**, 938–949 (2008).
14. Fritsma, G. A. Platelet Structure and Function. *Clin Lab Sci* **28**, 125–131 (2015).
15. FUKUDA, T., ASOU, E., NOGI, K. & GOTO, K. Evaluation of mouse red blood cell and platelet counting with an automated hematology analyzer. *J Vet Med Sci* **79**, 1707–1711 (2017).

16. Gresele, P., Falcinelli, E., Sebastiano, M. & Momi, S. Matrix Metalloproteinases and Platelet Function. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 147 133–165 (Elsevier, 2017).
17. Lenting, P. J., Christophe, O. D. & Denis, C. V. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* **125**, 2019–2028 (2015).
18. Weiss, H. J. Analytic Review: Von Willebrand's Disease-Diagnostic Criteria. *Blood* **32**, 668–679 (1968).
19. Joly, B. S., Coppo, P. & Veyradier, A. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **129**, 2836–2846 (2017).
20. Rapaport, S. I. & Rao, L. V. The tissue factor pathway: how it has become a 'prima ballerina'. *Thromb Haemost* **74**, 7–17 (1995).
21. Mackman, N., Tilley, R. E. & Key, N. S. Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**, 1687–1693 (2007).
22. Grover, S. P. & Mackman, N. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **39**, 331–338 (2019).
23. Meier, H. L., Pierce, J. V., Colman, R. W. & Kaplan, A. P. Activation and function of human Hageman factor. The role of high molecular weight kininogen and prekallikrein. *J Clin Invest* **60**, 18–31 (1977).
24. Chapin, J. C. & Hajjar, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev* **29**, 17–24 (2015).
25. Cesarman-Maus, G. & Hajjar, K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology* **129**, 307–321 (2005).
26. Virchow, R. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. (Meidinger, 1856).
27. Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 34–45 (2013).
28. Stark, K. & Massberg, S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nat Rev Cardiol* **18**, 666–682 (2021).
29. Denis Cécile V. & Wagner Denisa D. Platelet Adhesion Receptors and Their Ligands in Mouse Models of Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**, 728–739 (2007).
30. Mackman, N. Role of Tissue Factor in Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Development. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**, 1015–1022 (2004).

31. Mackman, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* **451**, 914–918 (2008).
32. Hron, G. *et al.* Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost* **97**, 119–123 (2007).
33. Polgar, J., Matuskova, J. & Wagner, D. D. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* **3**, 1590–1596 (2005).
34. Yau, J. W., Teoh, H. & Verma, S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovascular Disorders* **15**, 130 (2015).
35. Wood, J. P., Ellery, P. E. R., Maroney, S. A. & Mast, A. E. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood* **123**, 2934–2943 (2014).
36. Kökten, T., Hansmann, F., Melhem, H. & Peyrin-Biroulet, L. Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). *Hegel N° 2*, 119–129 (2016).
37. Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F. & Peyrin-Biroulet, L. Crohn's disease. *The Lancet* **389**, 1741–1755 (2017).
38. Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L. & Colombel, J.-F. Ulcerative colitis. *Lancet* **389**, 1756–1770 (2017).
39. Jukic, A., Bakiri, L., Wagner, E. F., Tilg, H. & Adolph, T. E. Calprotectin: from biomarker to biological function. *Gut* **70**, 1978–1988 (2021).
40. Harvey, R. F. & Bradshaw, J. M. A SIMPLE INDEX OF CROHN'S-DISEASE ACTIVITY. *The Lancet* **315**, 514 (1980).
41. Rutgeerts, P. *et al.* Infliximab for Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *New England Journal of Medicine* **353**, 2462–2476 (2005).
42. Marchal-Bressenot, A. *et al.* Development and validation of the Nancy histological index for UC. *Gut* **66**, 43–49 (2017).
43. Sutherland, L. R. & MacDonald, J. K. Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2006) doi:10.1002/14651858.CD000543.pub2.
44. Ford, A. C. *et al.* Efficacy of 5-aminosalicylates in Crohn's disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **106**, 617–629 (2011).
45. Hendy, P., Hart, A. & Irving, P. Anti-TNF drug and antidrug antibody level monitoring in IBD: a practical guide. *Frontline Gastroenterol* **7**, 122–128 (2016).
46. Jovani, M. & Danese, S. Vedolizumab for the treatment of IBD: a selective therapeutic approach targeting pathogenic a4b7 cells. *Curr Drug Targets* **14**, 1433–1443 (2013).
47. Lamb, C. A. *et al.* British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the

management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* **68**, s1–s106 (2019).

48. Sandborn, W. J. *et al.* Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med* **376**, 1723–1736 (2017).
49. Caillo, L. & Bourgaux, J. F. Chirurgie digestive chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sous biothérapies. *Anesthésie & Réanimation* **5**, 248–250 (2019).
50. Foster, A. & Jacobson, K. Changing Incidence of Inflammatory Bowel Disease: Environmental Influences and Lessons Learnt from the South Asian Population. *Frontiers in Pediatrics* **1**, (2013).
51. Mahid, S. S., Minor, K. S., Soto, R. E., Hornung, C. A. & Galandiuk, S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* **81**, 1462–1471 (2006).
52. Johnson, G. J., Cosnes, J. & Mansfield, J. C. Review article: smoking cessation as primary therapy to modify the course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **21**, 921–931 (2005).
53. Boyko, E. J., Koepsell, T. D., Perera, D. R. & Inui, T. S. Risk of ulcerative colitis among former and current cigarette smokers. *N Engl J Med* **316**, 707–710 (1987).
54. Higuchi, L. M. *et al.* A Prospective Study of Cigarette Smoking and the Risk of Inflammatory Bowel Disease in Women. *Am J Gastroenterol* **107**, 1399–1406 (2012).
55. Abegunde, A. T., Muhammad, B. H., Bhatti, O. & Ali, T. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. *World J Gastroenterol* **22**, 6296–6317 (2016).
56. Hugot, J. P. *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 599–603 (2001).
57. Ek, W. E., D'Amato, M. & Halfvarson, J. The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* **27**, 294–303 (2014).
58. Pascal, V. *et al.* A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* **66**, 813–822 (2017).
59. Miyoshi, J. & Chang, E. B. The gut microbiota and inflammatory bowel diseases. *Transl Res* **179**, 38–48 (2017).
60. Dominguez-Bello, M. G., Blaser, M. J., Ley, R. E. & Knight, R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology* **140**, 1713–1719 (2011).
61. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).
62. Scanlan, P. D., Shanahan, F., O'Mahony, C. & Marchesi, J. R. Culture-independent

- analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J Clin Microbiol* **44**, 3980–3988 (2006).
63. Turnbaugh, P. J. *et al.* The human microbiome project. *Nature* **449**, 804–810 (2007).
 64. Peterson, D. A., Frank, D. N., Pace, N. R. & Gordon, J. I. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* **3**, 417–427 (2008).
 65. Fumery, M. *et al.* Thromboembolic events and cardiovascular mortality in inflammatory bowel diseases: A meta-analysis of observational studies. *J Crohns Colitis* **8**, 469–479 (2014).
 66. Cheng, K. & Faye, A. S. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **26**, 1231–1241 (2020).
 67. Novacek, G. *et al.* Inflammatory Bowel Disease Is a Risk Factor for Recurrent Venous Thromboembolism. *Gastroenterology* **139**, 779–787.e1 (2010).
 68. Koutroumpakis, E. I., Tsiolakidou, G. & Koutroubakis, I. E. Risk of venous thromboembolism in patients with inflammatory bowel disease. *Semin Thromb Hemost* **39**, 461–468 (2013).
 69. Magro, F., Soares, J.-B. & Fernandes, D. Venous thrombosis and prothrombotic factors in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **20**, 4857–4872 (2014).
 70. Schünemann, H. J. *et al.* American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: prophylaxis for hospitalized and nonhospitalized medical patients. *Blood Adv* **2**, 3198–3225 (2018).
 71. Solitano, V., Fiorino, G., D'Amico, F., Peyrin-Biroulet, L. & Danese, S. Thrombosis in IBD in the Era of JAK Inhibition. *Current Drug Targets* **22**, 126–136.
 72. Sandborn, W. J. *et al.* Venous thromboembolic events in the tofacitinib ulcerative colitis clinical development programme. *Aliment Pharmacol Ther* **50**, 1068–1076 (2019).
 73. Higgins, P. D. R., Skup, M., Mulani, P. M., Lin, J. & Chao, J. Increased Risk of Venous Thromboembolic Events With Corticosteroid vs Biologic Therapy for Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **13**, 316–321 (2015).
 74. Taylor, P. C. *et al.* Cardiovascular Safety During Treatment With Baricitinib in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* **71**, 1042–1055 (2019).
 75. Bollen, L. *et al.* Short-term effect of infliximab is reflected in the clot lysis profile of patients with inflammatory bowel disease: a prospective study. *Inflamm Bowel Dis* **21**, 570–578 (2015).
 76. deFonseka, A. M., Tuskey, A., Conaway, M. R. & Behm, B. W. Antitumor Necrosis Factor- α Therapy Is Associated With Reduced Risk of Thromboembolic Events in Hospitalized

- Patients With Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol* **50**, 578–583 (2016).
77. Olivera, P. A. *et al.* International consensus on the prevention of venous and arterial thrombotic events in patients with inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **18**, 857–873 (2021).
 78. Mizoguchi, A. Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (ed. Conn, P. M.) vol. 105 263–320 (Academic Press, 2012).
 79. Sadlack, B. *et al.* Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* **75**, 253–261 (1993).
 80. Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Müller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263–274 (1993).
 81. Abraham, C. & Cho, J. H. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* **361**, 2066–2078 (2009).
 82. Franke, A. *et al.* Meta-Analysis Increases to 71 the Tally of Confirmed Crohn’s Disease Susceptibility Loci. *Nat Genet* **42**, 1118–1125 (2010).
 83. Matharu, K. S. *et al.* Toll-like receptor 4-mediated regulation of spontaneous Helicobacter-dependent colitis in IL-10 deficient mice. *Gastroenterology* **137**, 1380-1390.e3 (2009).
 84. Okayasu, I. *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**, 694–702 (1990).
 85. Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M. & Vijay-Kumar, M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice: DSS-Induced Colitis in Mice. in *Current Protocols in Immunology* (eds. Coligan, J. E., Bierer, B. E., Margulies, D. H., Shevach, E. M. & Strober, W.) 15.25.1-15.25.14 (John Wiley & Sons, Inc., 2014). doi:10.1002/0471142735.im1525s104.
 86. Kim, J. J., Shajib, M. S., Manocha, M. M. & Khan, W. I. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp* 3678 (2012) doi:10.3791/3678.
 87. Neurath, M., Fuss, I. & Strober, W. TNBS-Colitis. *International Reviews of Immunology* **19**, 51–62 (2000).
 88. Scheiffele, F. & Fuss, I. J. Induction of TNBS Colitis in Mice. *Current Protocols in Immunology* **49**, 15.19.1-15.19.14 (2002).
 89. Lenting, P. J., Casari, C., Christophe, O. D. & Denis, C. V. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **10**, 2428–2437 (2012).
 90. G. Meucci, F. Pareti, M. Vecchi, S. Serum von Willebrand Factor Levels in Patients with Inflammatory Bowel Disease Are Related to Systemic Inflammation. *Scandinavian*

Journal of Gastroenterology **34**, 287–290 (1999).

91. Denis, C. *et al.* A mouse model of severe von Willebrand disease: Defects in hemostasis and thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 9524–9529 (1998).
92. Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S. & Sedergran, D. J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* **69**, 238–249 (1993).
93. Riley, S. A., Mani, V., Goodman, M. J., Dutt, S. & Herd, M. E. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* **32**, 174–178 (1991).
94. Murthy, S. K. & Nguyen, G. C. Venous Thromboembolism in Inflammatory Bowel Disease: An Epidemiological Review. *American Journal of Gastroenterology* **106**, 713–718 (2011).
95. Miehsler, W. *et al.* Is inflammatory bowel disease an independent and disease specific risk factor for thromboembolism? *Gut* **53**, 542–548 (2004).
96. Giannotta, M., Tapete, G., Emmi, G., Silvestri, E. & Milla, M. Thrombosis in inflammatory bowel diseases: what's the link? *Thrombosis J* **13**, 14 (2015).
97. Harries, A. D., Fitzsimons, E., Fifield, R., Dew, M. J. & Rhoades, J. Platelet count: a simple measure of activity in Crohn's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* **286**, 1476 (1983).
98. Heits, F., Stahl, M., Ludwig, D., Stange, E. F. & Jelkmann, W. Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 757–760 (1999).
99. Yan, S. L. S. *et al.* Platelet Abnormalities during Colonic Inflammation: *Inflammatory Bowel Diseases* **19**, 1245–1253 (2013).
100. Shen, J. *et al.* Biomarkers of altered coagulation and fibrinolysis as measures of disease activity in active inflammatory bowel disease: a gender-stratified, cohort analysis. *Thromb Res* **123**, 604–611 (2009).
101. Biancone, L. *et al.* Circulating D dimer in inflammatory bowel disease. *Ital J Gastroenterol* **26**, 116–120 (1994).
102. van Bodegraven, A. A., Schoorl, M., Linskens, R. K., Bartels, P. C. & Tuynman, H. A. Persistent activation of coagulation and fibrinolysis after treatment of active ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **14**, 413–418 (2002).
103. Palkovits, J. *et al.* Tissue factor exposing microparticles in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis* **7**, 222–229 (2013).
104. Saibeni, S. *et al.* Increased thrombin generation in inflammatory bowel diseases. *Thrombosis Research* **125**, 278–282 (2010).
105. Bernhard, H. *et al.* Thrombin generation in pediatric patients with Crohn's disease.

Inflamm Bowel Dis **17**, 2333–2339 (2011).

106. Tripodi, A. *et al.* Anti-TNF- α Treatment Reduces the Baseline Procoagulant Imbalance of Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* **27**, 1901–1908 (2021).

107. Didelot, M. *et al.* Platelet aggregation impacts thrombin generation assessed by calibrated automated thrombography. *Platelets* **29**, 156–161 (2018).

108. Irving, P. M. *et al.* Formation of platelet-leukocyte aggregates in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **10**, 361–372 (2004).

109. Pamuk, G. E. *et al.* Increased circulating platelet-neutrophil, platelet-monocyte complexes, and platelet activation in patients with ulcerative colitis: a comparative study. *Am J Hematol* **81**, 753–759 (2006).

110. Mills, D. C., Hunchak, K., Karl, D. W. & Kirby, E. P. Effect of platelet activation on the agglutination of platelets by von Willebrand factor. *Mol Pharmacol* **37**, 271–277 (1990).

111. Casari, C. *et al.* von Willebrand factor mutation promotes thrombocytopeny by inhibiting integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *J Clin Invest* **123**, 5071–5081 (2013).

112. Ruberto, F. *et al.* Von Willebrand factor with increased binding capacity is associated with reduced platelet aggregation but enhanced agglutination in COVID-19 patients: another COVID-19 paradox? *J Thromb Thrombolysis* **52**, 105–110 (2021).

113. Cibor, D. *et al.* Levels and activities of von Willebrand factor and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif, number 13 in inflammatory bowel diseases. *WJG* **23**, 4796 (2017).

114. Hulstein, J. J. J. *et al.* A novel nanobody that detects the gain-of-function phenotype of von Willebrand factor in ADAMTS13 deficiency and von Willebrand disease type 2B. *Blood* **106**, 3035–3042 (2005).

115. Chen, J. *et al.* Active Von Willebrand Factor (VWF) in Plasma of Sickle Cell Patients Is An Indicator of Disease Severity. *Blood* **114**, 2552 (2009).

116. Groot, E., de Groot, P. G., Fijnheer, R. & Lenting, P. J. The presence of active von Willebrand factor under various pathological conditions. *Current Opinion in Hematology* **14**, 284–289 (2007).

117. Munnix, I. C. A. *et al.* Segregation of Platelet Aggregatory and Procoagulant Microdomains in Thrombus Formation Regulation by Transient Integrin Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2484–2490 (2007).

118. Chu, Y., Guo, H., Zhang, Y. & Qiao, R. Procoagulant platelets: Generation, characteristics, and therapeutic target. *J Clin Lab Anal* **35**, e23750 (2021).

119. Pasalic, L. *et al.* Novel assay demonstrates that coronary artery disease patients have heightened procoagulant platelet response. *J Thromb Haemost* **16**, 1198–1210 (2018).
120. Bonaventura, A. *et al.* Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol* **21**, 319–329 (2021).
121. Loo, J., Spittle, D. A. & Newnham, M. COVID-19, immunothrombosis and venous thromboembolism: biological mechanisms. *Thorax* **76**, 412–420 (2021).
122. Kimball, A. S., Obi, A. T., Diaz, J. A. & Henke, P. K. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Frontiers in Immunology* **7**, (2016).
123. Li, T. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Induce Intestinal Damage and Thrombotic Tendency in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* **14**, 240–253 (2020).
124. Leppkes, M. *et al.* Neutrophils prevent rectal bleeding in ulcerative colitis by peptidyl-arginine deiminase-4-dependent immunothrombosis. *Gut* gutjnl-2021-324725 (2021) doi:10.1136/gutjnl-2021-324725.
125. Neeli, I., Khan, S. N. & Radic, M. Histone Deimination As a Response to Inflammatory Stimuli in Neutrophils. *J Immunol* **180**, 1895–1902 (2008).
126. Li, P. *et al.* PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 1853–1862 (2010).
127. Ferrière, S. *et al.* A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood* **136**, 740–748 (2020).
128. Barbon, E. *et al.* Single-domain antibodies targeting antithrombin reduce bleeding in hemophilic mice with or without inhibitors. *EMBO Mol Med* **12**, e11298 (2020).
129. Barg, A. A. *et al.* The potential role of emicizumab prophylaxis in severe von Willebrand disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **87**, 102530 (2021).
130. Randi, A. M., Smith, K. E. & Castaman, G. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. *Blood* **132**, 132–140 (2018).
131. Ishihara, J. *et al.* The heparin binding domain of von Willebrand factor binds to growth factors and promotes angiogenesis in wound healing. *Blood* **133**, 2559–2569 (2019).
132. Ford, A. C. *et al.* Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **106**, 644–659, quiz 660 (2011).
133. Vieujean, S., D’Amico, F., Netter, P., Danese, S. & Peyrin-Biroulet, L. Landscape of new drugs and targets in inflammatory bowel disease. *United European Gastroenterology Journal* **n/a**, (2022)

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comportent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Les MICI représentent un facteur de risque indépendant de thrombose (événements initiaux et récurrents). Une méta-analyse portant sur de grandes populations de MICI a mis en évidence un risque de thrombose 2 fois supérieur à celui de la population générale. Les causes de cette augmentation ne sont pas clairement identifiées. **Les objectifs** de ce travail de thèse ont été d'identifier des acteurs majeurs du risque de thrombose associés au MICI en étudiant plus particulièrement les plaquettes et le facteur von Willebrand (VWF). **Méthodes** : Pour évaluer le phénotype de coagulation, nous avons utilisés une cohorte de patients MICI inclus dans le projet IBANK du CHRU de Nancy. En parallèle, nous avons utilisés un modèle murin de colite expérimentale induite par le sulfate de dextran sodique (DSS). La coagulation a été évaluée en utilisant la génération de thrombine en plasma riche et pauvre en plaquettes. La cytométrie en flux a été utilisée pour préciser le phénotype plaquettaire. Plusieurs facteurs de la coagulation ont été mesurés par ELISA dont le facteur VWF antigénique et le facteur VWF actif. **Résultats** : Nous avons trouvé une augmentation de la génération de thrombine chez les patients de la cohorte IBANK par rapport à des sujets contrôles en plasma riche en plaquettes et en plasma pauvre en plaquettes. Des résultats similaires ont été observés chez des souris traitées au DSS en plasma riche en plaquettes. Dans le plasma pauvre en plaquettes, la courbe et le pic de génération de thrombine étaient similaires au groupe contrôle. Les souris et les patients de la cohorte IBANK présentaient un profil typique d'amas plaquettaire sur les frottis sanguins. Un facteur pouvant provoquer la formation de ces amas est le facteur VWF. Le facteur VWF circulant est augmenté chez les patients atteints de MICI et chez les souris, suggérant sa participation à l'état procoagulant. De plus, 20% des patients de la cohorte IBANK ont du facteur VWF circulant sous sa forme active, qui favorise l'agrégation des plaquettes. Nous avons donc traité des souris dépourvues de VWF avec du DSS. La génération de thrombine dans le plasma riche en plaquettes des souris dépourvues de VWF n'est pas augmentée en réponse au traitement par DSS. En revanche, ces souris ont présenté une aggravation des altérations du tissu colique, ce qui souligne l'importance du maintien d'un équilibre normal de la coagulation dans les maladies inflammatoires comme les MICI. **Conclusion** : Le phénotype procoagulant dans les MICI dépend de l'activation plaquettaire et de la libération plus importante de VWF sécrété par les plaquettes activées, soit par l'endothélium. Ces résultats suggèrent l'intérêt potentiel de thérapies ciblant spécifiquement le facteur VWF en association avec les traitements actuels.

Mots-clés : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, thrombose, plaquettes, facteur von Willebrand

Inflammatory bowel disease (IBD) includes Crohn's disease and ulcerative colitis. IBD is an independent risk factor for thrombosis (initial and recurrent events). A meta-analysis of IBD patients showed a risk of thrombosis 2 times higher than in the general population. The causes of this increase remain unclear. **The objectives** of this thesis work were to identify major thrombosis risk factors associated with IBD by studying platelets and von Willebrand factor (VWF). **Methods**: To evaluate the coagulation phenotype, we used a cohort of IBD patients from the IBANK project of the Nancy University Hospital. In parallel, we used a mouse model of experimental colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS). Coagulation was evaluated using thrombin generation in platelet rich and platelet poor plasma. Flow cytometry was used to specify the platelet phenotype. Several coagulation factors were measured by ELISA including antigenic VWF and active VWF. **Results**: We found an increase in thrombin generation in the IBANK cohort compared with controls in platelet-rich and platelet-poor plasma. Similar results were observed in DSS treated mice in platelet-rich plasma. In platelet-poor plasma of these mice, the thrombin generation curve and peak were similar to the control group. Mice and patients in the IBANK cohort had a typical platelet cluster pattern on blood smears. One factor that may cause these clusters to form is VWF. Circulating VWF was increased in IBD patients and in mice, suggesting its involvement in the procoagulant state. Furthermore, 20% of the IBANK cohort had circulating VWF in its active form, which promotes platelet aggregation. We therefore treated mice lacking VWF with DSS. Thrombin generation in platelet-rich plasma of VWF-deficient mice was not increased in response to DSS treatment. In contrast, these mice showed worsening of colonic tissue alterations, highlighting the importance of maintaining a normal coagulation balance in inflammatory diseases such as IBD. **Conclusion**: The procoagulant phenotype in IBD depends on platelet activation and increased release of VWF from activated platelets or from the endothelium. These results suggest the potential interest of therapies specifically targeting VWF in combination with current treatments of IBD.

Keywords: Inflammatory bowel disease, thrombosis, platelets, von Willebrand factor