



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



CORDIM

îledeFrance

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 420 :
SANTÉ PUBLIQUE PARIS SUD 11, PARIS DESCARTES

Laboratoire : Equip 1 de Unité INSERM UMR_S1166
Genomics & Pathophysiology of Cardiovascular Diseases

THÈSE DE DOCTORAT

SANTÉ PUBLIQUE - GÉNÉTIQUE STATISTIQUE

par

Ares ROCAÑIN ARJO

**Genetic and Epigenetic Determinants of Thrombin
Generation Potential: an epidemiological approach.**

Date de soutenance : 20/11/2014

Composition du jury :

Directeur de thèse :	David Alexandre TREGOUET	DR, INSERM U1166, Université Paris 6, Jussieu
Rapporteurs :	Guy MEYER	PU_PH, Service de pneumologie. Hôpital européen Georges Pompidou
	Richard REDON	DR, Institut thorax, UMR 1087 / CNRS 6291 , Université de Nantes
UMR		
Examineurs :	Laurent ABEL	DR, INSERM U980, Institut Imagine
	Marie Aline CHARLES	DR, INSERM U1018, CESP

Résumé en français

Contexte du projet et motivation

La thrombine, aussi connue sous le nom "facteur de coagulation II", est synthétisée dans le foie sous forme de zymogène: la prothrombine (ou FII), qui, une fois relâchée, est clivée, en exposant ses domaines et en activant ses fonctions (FIIa). Sa fonction la plus connue et la plus importante est celle de catalyseur de la formation de fibrine qui constituera le caillot, d'activateur d'autres facteurs pro-coagulants mais également de déclencheur d'enzymes anti-coagulantes(J. Borissoff, Spronk, & Ten Cate, 2011).

L'activation de la thrombine est le résultat de la cascade de coagulation à laquelle participent de nombreuses protéines (Tableau 1.1, page 6) s'activant les unes les autres (Figure 1.2., page 7). Le début de la coagulation a lieu quand le facteur tissulaire (TF) est exposé au sang, à cause d'une lésion des vaisseaux. Ensuite TF active le facteur VII (FVIIa, a pour activé) devenant le complexe TF-FVIIa qui active alors deux autres facteurs: le facteur IX et le facteur X. Le FXa seul est peu efficace et ne protéolyse qu'une petite quantité de prothrombine(Crawley, Zanardelli, Chion, & Lane, 2007). Cette petite, mais suffisante, quantité de thrombine activée (2 nmol / L) commence à interagir avec des cofacteurs et substrats en provoquant le début de réactions en chaîne menant à la coagulation(Crawley et al., 2007; Esmon, 2014; Furie & Furie, 2008; Licari & Kovacic, 2009; Mann, 2003).

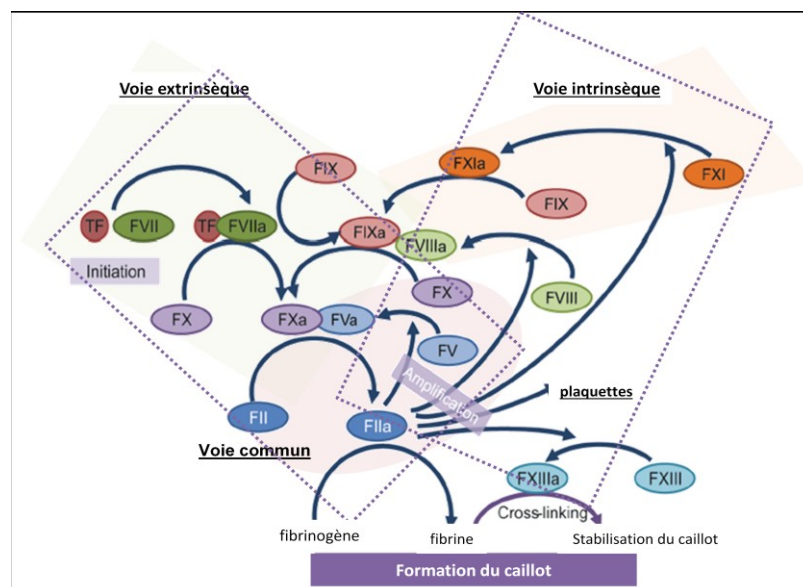


Figure 1. Cascade de coagulation (Adaptation de Esmon 2013(Esmon, 2014)). D'une part, les deux voies de la coagulation, intrinsèque et extrinsèque, qui permettent l'activation de la thrombine. D'une autre, les carrés de lignes pointillées délimitent, à gauche, l'initiation de la coagulation jusqu'à l'activation de la thrombine et à droite, l'amplification de la coagulation.

Tableau 1. Les actions et substrats de la thrombine (Crawley et al., 2007; Licari & Kovacic, 2009; Maragoudakis & Tsopanoglou, 2009).				
Substrat de thrombine	Cofacteur	Domaine thrombine	Function	Na⁺⁺/Ca⁺⁺
Fibrinogène	-	exosite I	Activation du fibrinogène -> à fibrine	+
FVIII	-	exosite I & II	Activation de FVIII -> FVIIIa	+
FV	-	exosite I & II	Activation de FV -> FVa	+
FXIII	fibrine	exosite I	Plus activation de la fibrine activation de FXIII -> FXIIIa = stabilisation de fibrine	+
FXI	Gplba	exosite I	Activation de FXI -> FXIa = activation voie intrinsèque	
<i>Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)</i>	TM		Activation de TAFI=TAFIa-> anti-fibrinolyse	
Glycoprotéine V	Gplba_exosite II	exosite I	Activation des plaquettes	
Thrombomoduline (TM)		exosite I	Inhibition physique des actions procoagulants	-
Protéine C (PC)	TM (exosite I et parfois II)	exosite I	Activation de PC résultant en: Inactivation de Va ->Vi et VIIIa->VIIIi	-
Cofacteur II de l'héparine (HCII)	glycosaminoglycans		Il remplace la fonction de antithrombine	
L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1)			Inhibition de plasmine formation; fibrinolyse	
Glycoprotéine Gplb-IX-V complexe récepteur de plaquettes		exosite II	Cofacteur. Il aide à cliver PAR et la glycoprotéine V par thrombine, FXI.	
<i>Protease activator inhibitor (PAR)</i> récepteur présent en presque tout les types cellulaires.		exosite I	<u>Cicatrisation de lésions des tissus</u> Il active le facteur d'activation plaquettaire (PAF) Croissance et différenciation cellulaire Prolifération du muscle lisse, macrophage et cellules endothéliales Angiogenèse	

<u>Pro-inflammatoire</u> Adhésion leucocytaire Mitogenèse de lymphocytes- Activation: IL-6, IL-8 <u>Vasoconstriction et</u> <u>perméabilité vasculaire</u> <u>permeability</u>			
	procoagulant		Anticoagulant
	Activation de la thrombine		Thrombine et les fonctions PAR

La thrombine protéolyse le fibrinogène en formant des unités de fibrine (Figure 2., flèche 1, page 10) qui vont être assemblées en fibres à fin de stabiliser le caillot. En outre, elle protéolyse les facteurs V et VIII (Figure 2., flèche 4, page 10) qui vont aider à amplifier l'activation de la thrombine. La thrombine va également activer des facteurs anticoagulants qui vont aider à contrôler et finaliser la coagulation.

La thrombine participe également, au-delà de l'hémostase, à d'autres systèmes physiologiques, comme par exemple les systèmes immunitaire, nerveux, gastro-intestinal, et musculo-squelettique. Elle interagit avec des protéines et des récepteurs, en activant les plaquettes et les cellules endothéliales, et en stimulant l'adhésion, l'angiogénèse, la croissance cellulaire, la différenciation, la prolifération, la vasoconstriction et l'inflammation. Tout ce large éventail de fonctions est modulé grâce à une combinaison complexe de substrats et de cofacteurs (Crawley et al., 2007) (Tableau 1. et 2., pages 6-7).

Pour toutes les fonctions expliquées ci-dessus, la régulation de la thrombine est fondamentale pour une physiologie normale. Des niveaux déséquilibrés de thrombine se traduisent par différents types d'anomalies. Les plus connues et étudiées sont la thrombose/l'hémophilie, l'inflammation et l'athérosclérose. Il est alors essentiel de pouvoir mesurer son activité aussi précisément que possible afin d'étudier et de comprendre les conséquences physiopathologiques et moléculaires de ses anomalies. Les tests classiques reflètent seulement 5% de l'ensemble du processus (Mann, 2003) de l'activation et de l'activité de la thrombine.

Le potentiel de génération de thrombine (TGP, en anglais) est un test qui a été mis à point pour mesurer la quantité potentielle de thrombine qui est capable d'être activée au moment de coagulation (Hemker et al., 2003). Il peut être vu comme un reflet l'ensemble du processus de la coagulation allant de son l'initiation, sa propagation et sa terminaison-amplification (Cimenti, Schlagenhaut, & Leschnik, 2013). Il est plus sensible aux déficits de facteurs de coagulation: activateurs (FVII, FV, FX) et inhibiteurs (antithrombine, protéine C,

protéine S) et à de nombreux troubles de la coagulation associés à une résistance à la protéine C activée (APC, en anglais). En outre, il est sensible à tous les types d'anticoagulants ou d'autres médicaments.

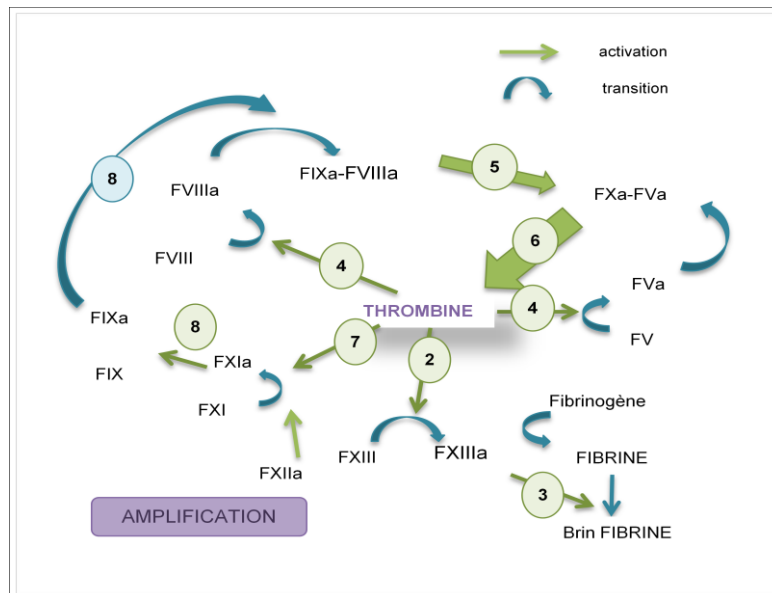


Figure 2. Étape d'amplification de la coagulation. Diagramme des principales actions de la thrombine qui permettent des réactions en chaîne. Les flèches 1,2 et 3 sont les réactions impliquées dans la formation de la fibrine; les autres flèches sont les réactions d'amplification.

Tableau 2. Interactions où la thrombine est le substrat.			
Enzyme	Cofacteur	Thrombine-Domain	Fonction
FX	-	-	Première activateur de la thrombine à partir de la prothrombine.
Complexe FVa-FXa	-	-	Activation de la à partir de la prothrombine.
Thrombomoduline (TM)	-	exosite I	Cofacteur
Antithrombine (AT)	Aucun ou glycosaminoglycans: heparin, heparan sulfate proteoglycans- (exosite II)	-	Sans cofacteur: AT inhibites la thrombine réversiblement et avec cofacteur, est irréversiblement. Il inactive aussi Xa -> Xi et IXa->Ixi;
Cofacteur II de l'héparine (HCII)	glycosaminoglycans	-	Il remplace la fonction de AT
Tissue factor pathway inhibitor (TFPI ou inhibiteur de la voie du facteur tissulaire)	-	-	Fibrinolysis-anticoagulant

Le potentiel de génération de thrombine (TGP, en anglais) est un test qui a été mis à point pour mesurer la quantité potentielle de thrombine qui est capable d'être activée au moment de coagulation (Hemker et al., 2003). Il peut être vu comme un reflet l'ensemble du processus de la coagulation allant de son l'initiation, sa propagation et sa terminaison-amplification (Cimenti et al., 2013). Il est plus sensible aux déficits de facteurs de coagulation: activateurs (FVII, FV, FX) et inhibiteurs (antithrombine, protéine C, protéine S) et à de nombreux troubles de la coagulation associés à une résistance à la protéine C activée (APC, en anglais). En outre, il est sensible à tous les types d'anticoagulants ou d'autres médicaments.

Le TGP est mesuré à partir d'une méthode, communément appelée thrombogramme calibré automatisé (CAT, en anglais), qui consiste en deux mesures simultanées de l'activation de la thrombine avec un substrat fluorochrome pour un même échantillon de plasma. L'une mesure la génération de thrombine (TG) et l'autre sert de calibrage pour corriger le biais entre le signal fluorochrome et l'activation de la thrombine. Dans le test TG, la thrombine est produite dans une réaction de coagulation activée par du facteur tissulaire, des phospholipides et du calcium. La quantité de thrombine générée est alors mesurée en temps réel par la capture du signal de fluorescence qui émet le substrat consommé par la thrombine. Ce signal est capturé et corrigé simultanément pour être affiché sous la forme du courbe (appelée thrombogramme) (Figure 3., page 24).

A partir de cette courbe, il est possible d'extraire plusieurs paramètres quantitatifs (Figure 4., page 25). Les plus utilisés sont : 1- le temps de latence (*Lagtime* en anglais) qui mesure le temps écoulé depuis le moment où la coagulation est déclenchée jusqu'à le début de formation du caillot; 2 - le potentiel endogène de thrombine (ETP pour *Endogeneous Thrombin Potential* en anglais) qui représente la totalité de thrombine activée (l'aire sous la courbe du thrombogramme) et permettant de représenter plus précisément l'état de coagulation et toute l'activité enzymatique autour la génération de la thrombine; 3- le hauteur du pic (*Peak, P*) qui mesure la quantité maximale de thrombine activée à un moment donné du processus de coagulation.

Le test TGP est sensible aux variations des facteurs FX, FIX, FVII et FVIII, du fibrinogène, des D-dimères (produits de la formation des unités de fibrine à partir de fibrinogène) et de protéines anticoagulantes. Le TGP est également associé à l'indice de masse corporelle (IMC), l'âge et le sexe. En ce qui concerne les facteurs génétiques connus pour influencer la variabilité interindividuelle du TGP, il en existait deux au moment où je commençais mon projet de thèse: les polymorphismes rs1799963 (20210G> A) et rs3136516 (19911A> G) du gène codant pour la prothrombine (F2).

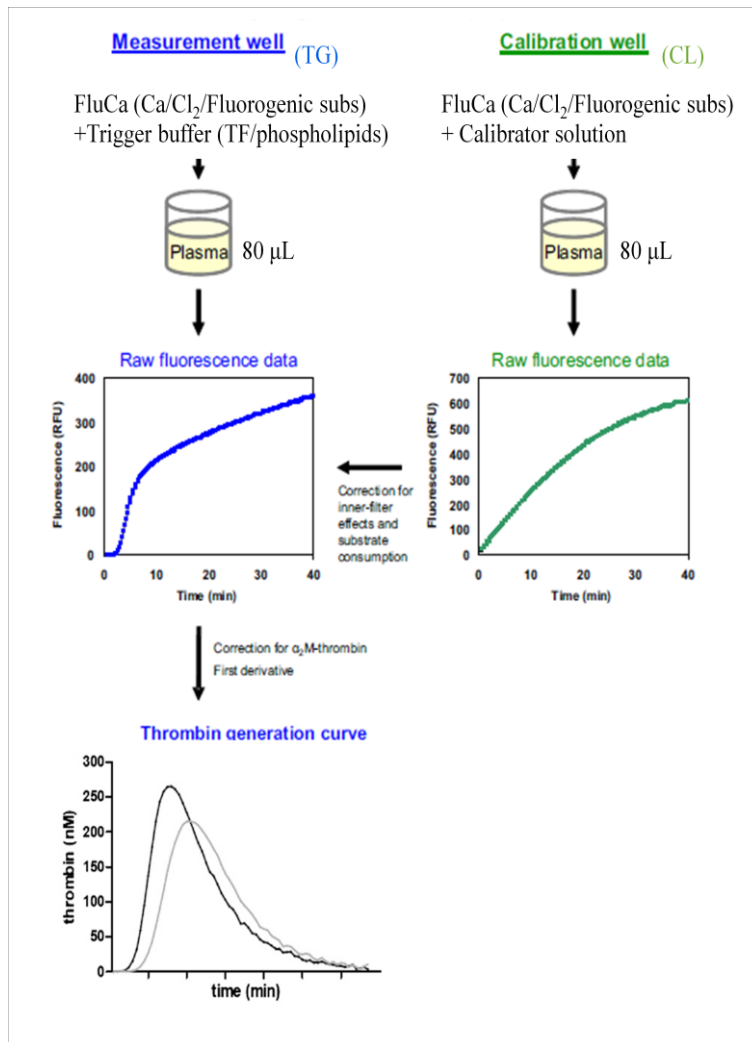


Figure 3. Diagramme de la méthode CAT. Adaption de *Castoldi et al.* 2011(Castoldi & Rosing, 2011). La mesure de la génération de la thrombine (TG) et le calibreur (CL) sont simultanément analysées et en suite combinées en créant un graphique final en représentant la génération de la thrombine.

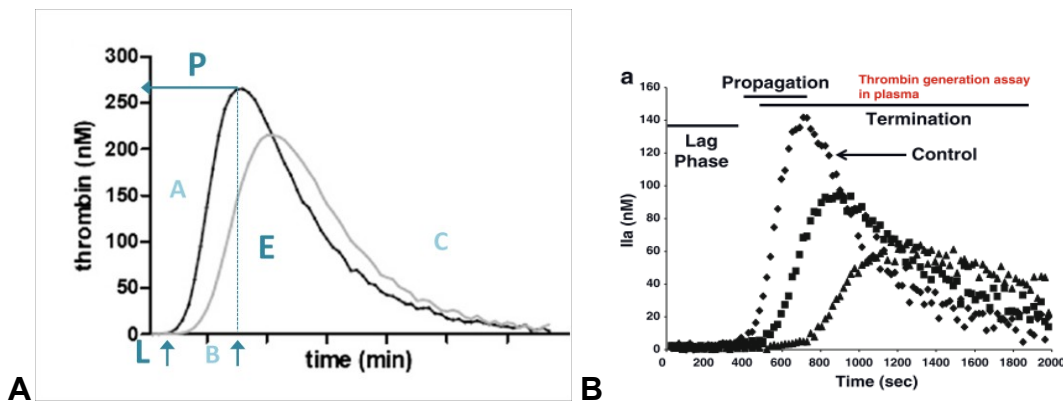


Figure 4. Les paramètres de la génération de la thrombine mesurés par la méthode CAT. A- (L) le temps de latence (min), (P) le pic (nM) et (E) le potentiel de la thrombine endogène (nM x min), ces sont les paramètres utilisés dans ce travail. B représente la comparaison des paramètres de la génération de la thrombine et la cascade de la coagulation(Brummel-Ziedins, Everse, Mann, & Orfeo, 2014).

Des niveaux élevés de TGP, en particulier d' ETP, ont été associés au risque de thrombose veineuse(Hron, Kollars, Binder, Eichinger, & Kyrle, 2006; Lutsey, Folsom,

Heckbert, & Cushman, 2010; Tripodi et al., 2008), aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques aigus (Carcaillon et al., 2011) et à l'infarctus du myocarde (Smid et al., 2013). En revanche, des niveaux bas d'ETP sont associés à des troubles de la coagulation (Al Dieri et al., 2002; Rugeri et al., 2010). Le TGP a également été trouvé associé à divers désordres cardiométaboliques comme l'athérosclérose (J. I. Borissoff et al., 2010; Vijil, Hermansson, Jeppsson, Bergström, & Hultén, 2014), l'obésité (Sonnevli et al., 2013), le diabète de type 2 (Ay, Hoellerl, Ay, & Brix, 2012), la néphropathie diabétique (van der Poll, 2011), et des troubles hépatiques comme la cirrhose (Potze et al., 2013). Des troubles inflammatoires ont également été associés aux TGP tels que la maladie de Crohn (Bernhard et al., 2011), la septicémie (Petros, Kliem, Siegemund, & Siegemund, 2012) et la drépanocytose (Noubouossie et al., 2012).

Objectifs:

Comme mentionné ci-dessus, seuls deux polymorphismes génétiques, tous les deux situés dans le gène *F2*, étaient connus pour influencer les taux plasmatiques de TGP. Cependant, ils n'expliquent que 11,3% de la variabilité interindividuelle de ce biomarqueur. Mon projet de thèse avait pour objectifs d'identifier de nouveaux facteurs génétiques et épigénétiques modulant ce phénotype et ses biomarqueurs associés.

Partie I Identification de nouveaux déterminants génétiques contrôlant la variabilité interindividuelle plasmatique du potentiel de génération de thrombine

Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai mené la toute première étude d'association génome-entier (*GWAS* pour Genome Wide Association Study en anglais) sur les biomarqueurs du TGP (à savoir ETP, Peak et Lagtime), afin d'identifier de nouveaux gènes participants à la variabilité du TGP.

Dans une première étape de découverte, j'ai testé l'association entre 6 652 054 de polymorphismes génétiques, plus précisément des polymorphismes de substitution d'un seul nucléotide (*SNP* pour *Single Nucleotide Polymorphism* in anglais), et la variabilité plasmatique des trois biomarqueurs du TGP dans deux échantillons rassemblant 1967 sujets. Outre les deux polymorphismes du gène *F2* déjà connus et mentionnés ci-dessus, j'ai identifié un polymorphisme au sein du gène *ORM1*, rs150611042, montrant une association statistique très forte ($p = 3.36 \cdot 10^{-7}$) avec le temps de latence (Lagtime). J'ai ensuite cherché à répliquer cette association dans deux autres échantillons indépendants rassemblant 1254 sujets. Dans cette deuxième étape de validation, le polymorphisme

rs150611042 a été retrouvé fortement associé ($p = 6.07 \cdot 10^{-9}$) à la variabilité interindividuelle du temps de latence. J'ai ensuite montré que, dans deux cohortes indépendantes, l'une de 745 sujets et l'autre de 1374 individus, l'allèle du polymorphisme rs150611042 qui diminuait le temps de latence était également associé à une diminution de l'expression monocyttaire du gène ORM1 ($p = 8.70 \cdot 10^{-10}$ et $p = 5.21 \cdot 10^{-16}$, respectivement). Des expériences fonctionnelles ont été réalisées pour compléter ce travail et ont confirmé *in vitro* l'association entre la molécule codée par le gène ORM1 et la génération de thrombine.

En conclusion, cette partie de mon travail de thèse a permis d'identifier un nouveau gène participant à la régulation de la production de thrombine. Les mécanismes précis de cette régulation restent cependant à élucider.

Partie II Marques de méthylation d'ADN associées au potentiel de génération de thrombine

La méthylation de l'ADN est une marque épigénétique qui consiste en l'addition enzymatique d'un groupement méthyle (CH_3 , une molécule de carbone et trois d'hydrogène) à la position 5 de carbone de la cytosine principalement dans le contexte de la séquence 5'-cytosine-guanine (communément appelé dinucléotide CpG). Ce groupe méthyle est transféré par une ADN méthyltransférase à partir d'une autre molécule appelée S-adenylmethylcysteine (SAM), qui devient une S-adenylhomocysteine (SAH). Dans le même temps, l'ADN méthyltransférase attire des protéines qui vont se lier l'ADN et réguler l'expression et la structure de la chromatine (Strachan & Read, 2010).

Ces dernières années, de plus en plus d'études ont démontré le rôle de la méthylation de l'ADN dans le développement des maladies humaines. Les premiers résultats ont été observés dans le domaine du cancer, mais étendus rapidement à d'autres maladies humaines complexes telles que la sclérose en plaques, le diabète, les maladies inflammatoires et cardiovasculaires (Bell et al., 2010; Horvath et al., 2012; Li, Beard, & Jaenisch, 1993; Matouk & Marsden, 2008; Robertson, 2005).

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, j'ai utilisé des données de méthylation mesurées dans des échantillons d'ADN sanguin à partir d'une technologie haut-débit, la puce HumanMethylation450K développée par la société Illumina, pour rechercher des marques de méthylation associées à la variabilité plasmatique des mêmes 3 biomarqueurs du TGP que ceux utilisés dans mon projet GWAS (Partie I). Cette puce permet de mesurer les niveaux de méthylation de l'ADN d'environ 480 000 sites CpG répartis tout au long du

génomique. Son utilisation dans de grandes cohortes épidémiologiques fait l'objet d'un enthousiasme très important en raison des récents succès qu'elle a permis d'obtenir pour détecter des marques de méthylation associés à des facteurs environnementaux, génétiques et biologiques (Dick et al., 2014; Frazier-Wood et al., 2014). Dans le cadre de mon projet, j'ai eu accès à deux échantillons, l'un de 238 sujets, l'autre de 187, dans lesquels cette puce de méthylation avait été utilisée à partir de l'ADN issu du sang périphérique des sujets, et pour lesquels les biomarqueurs du TGP avaient aussi été mesurés. J'ai ainsi réalisé la première étude de recherche agnostique d'associations entre des niveaux de méthylation de sites CpG et la variabilité plasmatique du TGP. Ce type de recherche est communément appelée MWAS pour *Methylome-Wide Association Study* en anglais. J'ai suivi une stratégie de recherche assez similaire à celle que j'avais appliquée pour mon étude GWAS. Malheureusement, je n'ai identifié aucune association robuste entre des niveaux de méthylation de l'ADN sanguin et les biomarqueurs de la génération de thrombine.

Conclusions

L'étude GWAS que j'ai menée sur les taux plasmatiques de 3 marqueurs de la génération de thrombine a permis d'identifier un nouveau gène, ORM1, participant à la modulation du temps de latence. Le polymorphisme que j'ai identifié n'est vraisemblablement pas le variant fonctionnel et les mécanismes d'action d'ORM1 sur la génération de thrombine ne sont clairement pas caractérisés. Mon travail n'a donc ouvert qu'une petite porte vers un champ de recherches beaucoup plus vaste qui reste à explorer. D'autres pistes mériteraient d'être également explorées pour mieux disséquer les mécanismes génétiques associés à la génération de thrombine. La recherche que j'ai effectuée ne s'est concentrée que sur des associations univariées entre SNPs et TGP alors qu'il serait également intéressant d'étudier si des phénomènes d'interaction entre SNPs peuvent également contribuer à influencer la génération de thrombine. De plus, alors que je me suis concentrée sur 3 biomarqueurs du TGP, il existe d'autres biomarqueurs qu'il serait également possible d'étudier dans le contexte d'une étude GWAS, ce qui pourrait mener à l'identification d'autres mécanismes de régulation.

L'étude MWAS que j'ai conduite sur les taux plasmatiques de TGP s'est avérée moins fructueuse que l'étude GWAS. Plusieurs explications peuvent être relevées. Tout d'abord, la taille des échantillons que j'ai analysés dans ce projet était relativement modeste par rapport à ceux dont je disposais pour mon étude GWAS. Je ne peux donc pas exclure un manque de puissance pour détecter des effets épigénétiques modérés, et disposer d'autres

échantillons mesurés à la fois pour la méthylation de l'ADN et le TGP serait alors le bienvenu. De plus, cette étude MWAS a été réalisée à partir de l'ADN du sang périphérique qui n'est peut-être pas le bon modèle pour étudier des mécanismes de méthylation de l'ADN de protéines principalement exprimées dans le foie. Il serait plus pertinent de pouvoir disposer de l'information sur la méthylation dans des cellules hépatocytaires mais à l'échelle épidémiologique, cela semble un peu plus compliqué.

Enfin, j'ai mené de manière indépendante mon étude GWAS et mon étude MWAS sans avoir intégré les résultats de l'une pour augmenter la puissance de l'autre. De nombreux travaux indiquent que les niveaux de méthylation d'un site CpG peuvent également être sous le contrôle génétique de polymorphisme(s). Il serait donc tout à fait intéressant de combiner les résultats que j'ai obtenus dans mes 2 projets pour essayer d'identifier des polymorphismes génétiques influençant les taux de TGP via des mécanismes de régulation de la méthylation d'ADN. Affaire à suivre...

Bibliographie

- Al Dieri, R., Peyvandi, F., Santagostino, E., Giansily, M., Mannucci, P. M., Schved, J. F., ... Hemker, H. C. (2002). The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding. *Thrombosis and Haemostasis*, 88(4), 576–82. doi:10.1267/th02100576
- Ay, L., Hoellerl, F., Ay, C., & Brix, J. (2012). Thrombin generation in type 2 diabetes with albuminuria and macrovascular disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 42(5), 470–477. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2362.2011.02602.x/full>
- Bell, C. G., Finer, S., Lindgren, C. M., Wilson, G. a, Rakyan, V. K., Teschendorff, A. E., ... Hitman, G. a. (2010). Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus. *PLoS One*, 5(11), e14040. doi:10.1371/journal.pone.0014040
- Bernhard, H., Deutschmann, A., Leschnik, B., Schweintzger, S., Novak, M., Hauer, A., & Muntean, W. (2011). Thrombin generation in pediatric patients with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(11), 2333–9. doi:10.1002/ibd.21631
- Borissoff, J. I., Heeneman, S., Kiliç, E., Kassák, P., Van Oerle, R., Winckers, K., ... Spronk, H. M. H. (2010). Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation*, 122(8), 821–30. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.907121
- Borissoff, J., Spronk, H. M. H., & Ten Cate, H. (2011). The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 364, 1746–1760. Retrieved from <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1011670>
- Brummel-Ziedins, K. E., Everse, S. J., Mann, K. G., & Orfeo, T. (2014). Modeling thrombin generation: plasma composition based approach. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 37(1), 32–44. doi:10.1007/s11239-013-1006-9
- Carcaillon, L., Alhenc-Gelas, M., Bejot, Y., Spaft, C., Ducimetière, P., Ritchie, K., ... Scarabin, P.-Y. (2011). Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(6), 1445–51. doi:10.1161/ATVBAHA.111.223453
- Castoldi, E., & Rosing, J. (2011). Thrombin generation tests. *Thrombosis Research*, 127 Suppl , S21–5. doi:10.1016/S0049-3848(11)70007-X
- Cimenti, C., Schlagenhaut, A., & Leschnik, B. (2013). Low endogenous thrombin potential in trained subjects. *Thrombosis Research*, 131, 281–285. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049384813001412>
- Crawley, J. T. B., Zanardelli, S., Chion, C. K. N. K., & Lane, D. a. (2007). The central role of thrombin in hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 5(Suppl 1), 95–101. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02500.x

- Dick, K. J., Nelson, C. P., Tsaprouni, L., Sandling, J. K., Aïssi, D., Wahl, S., ... Samani, N. J. (2014). DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet*, 383(13), 1–9. doi:10.1016/S0140-6736(13)62674-4
- Esmon, C. (2014). Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond. *Thrombosis and Haemostasis*, 111(4), 1–9. doi:10.1160/TH13-09-0730
- Frazier-Wood, A. C., Aslibekyan, S., Absher, D. M., Hopkins, P. N., Sha, J., Tsai, M. Y., ... Arnett, D. K. (2014). Methylation at CPT1A locus is associated with lipoprotein subfraction profiles. *Journal of Lipid Research*, 55(7), 1324–1330. doi:10.1194/jlr.M048504
- Furie, B., & Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *The New England Journal of Medicine*, 359(9), 938–49. doi:10.1056/NEJMra0801082
- Hemker, H. C., Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., de Smedt, E., Wagenvoord, R., ... Béguin, S. (2003). Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 33(1), 4–15. doi:10.1159/000071636
- Horvath, S., Zhang, Y., Langfelder, P., Kahn, R. S., Boks, M. P., van Eijk, K., ... Ophoff, R. a. (2012). Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. *Genome Biology*, 13(10), R97. doi:10.1186/gb-2012-13-10-r97
- Hron, G., Kollars, M., Binder, B. R., Eichinger, S., & Kyrle, P. a. (2006). Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 296(4), 397–402. doi:10.1001/jama.296.4.397
- Li, E., Beard, C., & Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366, 362–365. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v366/n6453/abs/366362a0.html>
- Licari, L. G., & Kovacic, J. P. (2009). Thrombin physiology and pathophysiology. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 19(1), 11–22. doi:10.1111/j.1476-4431.2009.00383.x
- Lutsey, P. L., Folsom, A. R., Heckbert, S. R., & Cushman, M. (2010). Peak Thrombin Generation and Subsequent Venous Thromboembolism: The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). *October*, 7(10), 1639–1648. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03561.x.Peak
- Mann, K. G. (2003). Thrombin formation. *Chest*, 124(3 Suppl), 4S–10S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970118>
- Maragoudakis, M. E., & Tsopanoglou, N. E. (2009). *Thrombin: Physiology and Disease*. (M. E. Maragoudakis & N. E. Tsopanoglou, Eds.) (p. 266 pages). New York: Springer.
- Matouk, C. C., & Marsden, P. a. (2008). Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circulation Research*, 102(8), 873–87. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.171025

- Noubouossie, D. F., Lê, P. Q., Corazza, F., Debaugnies, F., Rozen, L., Ferster, A., & Demulder, A. (2012). Thrombin generation reveals high procoagulant potential in the plasma of sickle cell disease children. *American Journal of Hematology*, *87*(2), 145–9. doi:10.1002/ajh.22206
- Petros, S., Kliem, P., Siegemund, T., & Siegemund, R. (2012). Thrombin generation in severe sepsis. *Thrombosis Research*, *129*(6), 797–800. doi:10.1016/j.thromres.2011.08.004
- Potze, W., Arshad, F., Adelmeijer, J., Blokzijl, H., van den Berg, A. P., Meijers, J. C. M., ... Lisman, T. (2013). Decreased tissue factor pathway inhibitor (TFPI)-dependent anticoagulant capacity in patients with cirrhosis who have decreased protein S but normal TFPI plasma levels. *British Journal of Haematology*, *162*(6), 819–26. doi:10.1111/bjh.12462
- Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Reviews. Genetics*, *6*(8), 597–610. doi:10.1038/nrg1655
- Rugeri, L., Quélin, F., Chatard, B., De Mazancourt, P., Negrier, C., & Dargaud, Y. (2010). Thrombin generation in patients with factor XI deficiency and clinical bleeding risk. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, *16*(5), 771–7. doi:10.1111/j.1365-2516.2010.02246.x
- Smid, M., Dielis, A. W. J. H., Spronk, H. M. H., Rumley, A., van Oerle, R., Woodward, M., ... Lowe, G. (2013). Thrombin generation in the Glasgow Myocardial Infarction Study. *PloS One*, *8*(6), e66977. doi:10.1371/journal.pone.0066977
- Sonnevi, K., Tchaikovski, S. N., Holmström, M., Antovic, J. P., Bremme, K., Rosing, J., & Lärfars, G. (2013). Obesity and thrombin-generation profiles in women with venous thromboembolism. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, *24*, 1–7. doi:10.1097/MBC.0b013e32835f93d5
- Strachan, T., & Read, A. (2010). *Human Molecular Genetics* (4th editio., p. 781). New York: Garland Science/Taylor & Francis Group.
- Tripodi, A., Legnani, C., Chantarangkul, V., Cosmi, B., Palareti, G., & Mannucci, P. M. (2008). High thrombin generation measured in the presence of thrombomodulin is associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, *6*(8), 1327–33. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03018.x
- Van der Poll, T. (2011). Thrombin and diabetic nephropathy. *Blood*, *117*(19), 5015–6. doi:10.1182/blood-2011-03-342733
- Vijil, C., Hermansson, C., Jeppsson, A., Bergström, G., & Hultén, L. M. (2014). Arachidonate 15-lipoxygenase enzyme products increase platelet aggregation and thrombin generation. *PloS One*, *9*(2), e88546. doi:10.1371/journal.pone.0088546