



**HAL**  
open science

# Effets anti-inflammatoires de l'inhibiteur dépendant de la protéine Z : intérêt potentiel comme traitement adjuvant du sepsis

Mahita Razanakolona

## ► To cite this version:

Mahita Razanakolona. Effets anti-inflammatoires de l'inhibiteur dépendant de la protéine Z : intérêt potentiel comme traitement adjuvant du sepsis. Biotechnologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS564 . tel-02158060

**HAL Id: tel-02158060**

**<https://theses.hal.science/tel-02158060>**

Submitted on 17 Jun 2019

**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.

# Effets anti-inflammatoires de l'inhibiteur dépendant de la protéine Z : intérêt potentiel comme traitement adjuvant du sepsis

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué  
Spécialité de doctorat: sciences pharmacologiques

Thèse présentée et soutenue à Kremlin-Bicêtre, le 20 décembre 2018, par

**Mahita RAZANAKOLONA**

Composition du Jury :

Delphine BORGEL PU-PH, UMR-S 1176	Président
Omar BENZAKOUR PU-PH, U1082	Rapporteur
Marie-Christine BOUTON DR, INSERM U1148	Rapporteur
Nadia AISSAOUI MCU-PH, APHP HEGP	Examineur
Julie BOISRAME-HELMS MCU-PH, CHU Strasbourg	Examineur
Marc VASSE PU-PH, UMR-S 1176	Directeur de thèse

## **Remerciements**

Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de thèse, le Pr Marc Vasse, pour son encadrement durant ces années que nous avons passées ensemble. Ton encadrement ne s'est pas limité aux conseils et directives scientifiques, tu as beaucoup donné de ton temps et de ton énergie pour me soutenir et m'accompagner. J'ai énormément appris au cours de ces années, j'ai grandi aussi ; et tes conseils me suivront pour le restant de mon parcours professionnel et même au-delà.

Ensuite, je tiens à exprimer ma reconnaissance à Cécile Denis pour m'avoir accueilli au sein de l'unité et pour sa bienveillance. J'ai également une profonde reconnaissance pour Delphine Borgel, notre responsable d'équipe, qui, malgré la multitude de projets en cours à superviser, a toujours su trouver du temps pour m'écouter et me conseiller. Vous arrivez toujours à trouver les mots pour nous redonner courage et persévérer. En plus de vos conseils scientifiques, vos qualités humaines font de vous une directrice hors-pair.

Je remercie aussi les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, notamment Mme Marie-Christine Bouton, M. Omar Benzakour, Mme Nadia Aissaoui et Mme Julie Boisramé. Merci d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit et merci pour votre présence le jour de la présentation malgré la distance pour certains.

Je tenais aussi à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse et de ces travaux de recherche. A Allan De Carvalho pour ton assistance technique et tes idées ingénieuses, tu m'en aurais voulu si je ne t'avais pas cité en premier et tu aurais eu raison. Avec François Saller, vous m'avez « coaché » pour que je puisse prendre mon envol. Je resterai toujours fasciné par la minutie dont fait preuve François, que j'essaie tant bien que mal d'imiter. Merci à Elsa Bianchini et Frédéric Adam, d'avoir participé à l'obtention de tous ces résultats et de m'avoir épaulé sur les différentes expériences, vos regards critiques et remarques pertinentes ont permis de mener à bien ce travail. Merci à nos collaborateurs de Strasbourg et plus particulièrement Julie Boisramé, pour ta réactivité et ta disponibilité. Merci à Christelle Repérant, pour ton aide, d'autant plus que tu es arrivée vers la fin donc ça n'a pas dû être facile de travailler avec quelqu'un d'aussi stressé.

Merci à tous les membres de l'unité, je ne peux pas tous vous citer mais vous m'avez tous un peu aidé d'une manière ou d'une autre, et j'ai partagé des moments particuliers avec presque chacun de vous. Grâce à vous, j'ai pu mener ces années de thèse dans la bonne humeur et dans un bon état d'esprit.

Enfin, je remercie particulièrement toute ma famille, vous avez toujours été là pour moi et c'est en pensant à vous que j'ai pu avoir la force de continuer dans les moments les plus difficiles. Merci aussi à Claire, celle qui me supporte au quotidien.

## **Table des matières**

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux .....	4
Liste des abréviations .....	5
Introduction .....	7
Rappels bibliographiques .....	9
I- Place du système PZ/ZPI dans la coagulation .....	11
1) L'hémostase et la coagulation.....	11
a) La voie du facteur tissulaire .....	11
b) La voie de la phase contact .....	12
2) Régulation de la coagulation.....	17
a) Le TFPI .....	17
b) Le système de la protéine C .....	18
c) L'antithrombine.....	18
d) L'inhibition de la voie du système contact.....	19
3) Régulation de la coagulation par le système Protéine Z et ZPI .....	20
a) La Protéine Z (PZ).....	20
b) L'inhibiteur dépendant de la protéine Z (ZPI) .....	23
<i>Inhibition du FXa par le ZPI.....</i>	25
<i>Inhibition du FXIa par le ZPI .....</i>	28
<i>Inhibition du FIXa.....</i>	29
c) Le complexe PZ-ZPI .....	29
<i>Complexe équimolaire .....</i>	29
<i>Sites d'interaction entre la PZ et le ZPI.....</i>	29
d) Relevance physiologique.....	31
<i>Souris déficientes en PZ et ZPI .....</i>	31
II- Le système PZ et ZPI en pathologie .....	33
1) Valeurs de référence chez le sujet sain .....	33
2) Variations physiopathologiques.....	35
a) Dans les maladies hémorragiques .....	35
b) Dans la pathologie thrombo-embolique .....	36
c) Au cours de la grossesse normale ou pathologique.....	39
d) Syndrome des antiphospholipides (SAPL).....	42
e) Inflammation .....	43

f) Dans les cancers .....	45
g) Polymorphismes/mutations et phénotypes associés .....	46
III- Interactions entre coagulation et inflammation .....	48
1) Le système immunitaire inné .....	48
2) L'immuno-thrombose.....	49
3) Système contact et inflammation .....	53
IV- Le sepsis.....	56
1) Epidémiologie et définitions .....	56
2) Les scores de l'ISTH et du JAAM pour l'identification d'une CIVD.....	58
3) La sécrétion de cytokines pendant le sepsis.....	60
4) Rôle des inhibiteurs physiologiques de la coagulation dans le sepsis – Modulation pharmacologique.....	62
5) Inhibition de la voie du système contact.....	65
6) Le système PZ/ZPI et sepsis .....	67
Résultats .....	69
1 <sup>ère</sup> partie : Démonstration d'un effet anti-inflammatoire du ZPI .....	73
The Protein Z-dependent protease inhibitor has an <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> anti-inflammatory activity .....	75
Résultats supplémentaires.....	99
Matériels et méthodes .....	100
Résultats.....	104
Discussion et conclusion.....	108
2 <sup>ème</sup> partie : Etude de l'impact des NETs sur l'activité anticoagulante du ZPI .....	111
Introduction.....	111
Matériels et méthodes .....	112
Résultats.....	115
Discussion et conclusion.....	122
3 <sup>ème</sup> partie : Etude des variations du taux de PZ et ZPI au cours du choc septique.....	123
Introduction.....	123
Matériels et méthodes .....	124
Résultats.....	126
Discussion et conclusion.....	132
Discussion générale et perspectives .....	135
Bibliographie .....	149

## Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'activation du FXII.....	13
Figure 2 : Structures schématiques du facteur XI (FXI), de la prékallikréine (PK) et du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM).....	15
Figure 3 : Schéma simplifié des interactions entre les facteurs de la voie du système contact. .....	15
Figure 4 : Interactions des protéines du système contact avec différents récepteurs cellulaires. .....	16
Figure 5 : Représentation schématique du gène de la protéine Z (PROZ) (43). ....	20
Figure 6 : Représentation schématique de la structure de la Protéine Z (49).....	21
Figure 7 : Importance du domaine Gla pour la sécrétion de la PZ.....	22
Figure 8 : Structure tridimensionnelle du ZPI, archétype des serpins.....	24
Figure 9 : Mécanisme d'inhibition des serpins.....	26
Figure 10 : Inhibition du FXa par le ZPI.....	27
Figure 11 : Sites d'interaction entre la PZ et le ZPI.....	30
Figure 12 : Effet d'un déficit en PZ ou ZPI sur la mortalité induite par injection de collagène et d'adrénaline (A) ou sur l'application de chlorure ferrique sur la carotide (B).....	32
Figure 13 : Variations du taux (en pourcentages) de PZ et ZPI pendant et après traitement à la warfarine.....	35
Figure 14 : Concentration plasmatique de la PZ chez des patients avec des problèmes hémorragiques.....	36
Figure 15 : Distribution de la concentration plasmatique de PZ chez les témoins et les patients ayant eu une thrombose veineuse profonde (TVP) ou un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique (87). ....	37
Figure 16 : Méta-analyse du risque thrombotique artériel associé à une diminution du taux plasmatique de protéine Z (103).....	38
Figure 17 : Variations des taux plasmatiques de PZ et ZPI au cours de la grossesse.....	40
Figure 18 : Variations des taux plasmatiques de PZ et ZPI après injection sous-cutanée de turpentine chez des souris « sauvages » ou déficientes (KO) en PZ ou ZPI. ....	45
Figure 19 : Fixation du LPS à son récepteur TLR4 et induction de la sécrétion de cytokines.....	49
Figure 20 : Rôle des récepteurs aux protéases activées (PARs) dans l'interrelation entre l'inflammation et la coagulation. ....	50
Figure 21 : Image en microscopie électronique d'un polynucléaire neutrophile formant des NETs.....	51
Figure 22 : Rétention des pathogènes par l'immunothrombose.....	52
Figure 23 : Activités pro-inflammatoires des produits d'activation de la voie du système contact. ....	55
Figure 24 : Critères permettant d'identifier le sepsis ou le choc septique chez les patients (207). ....	57
Figure 25 : Taux plasmatiques des cytokines secrétées après ligature et ponction caecale (LPC) chez des souris « sauvages » ou déficientes en facteur XI. ....	67

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Constantes d'inhibition ( $K_i$ ) du FXIa plasmatique par les serpins.....	28
Tableau 2 : Comparaison des fréquences génétiques de souris déficitaires en PZ ou ZPI avec des souris FV <sub>Leiden</sub> (FV $\lambda$ ). .....	32
Tableau 3 : Taux plasmatique de la PZ chez des sujets sains en fonction de l'origine géographique. ....	33
Tableau 4 : Comparaison des taux plasmatiques de PZ chez des hommes et femmes dépourvus de pathologie.....	34
Tableau 5 : Déficit en PZ et complications obstétricales. ....	41
Tableau 6 : Impact des polymorphismes de la PZ sur sa concentration plasmatique (145). ...	46
Tableau 7 : Polymorphismes nucléotidiques ( <i>single-nucleotide polymorphism, SNP</i> ) du gène codant pour le ZPI chez les patients avec des fausses couches à répétition.....	47
Tableau 8 : Score diagnostique de la CIVD selon la <i>Japanese Association for Acute Medicine</i> (JAAM) (213).....	59
Tableau 9 : Algorithme diagnostique pour la CIVD « décompensée » selon l' <i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i> (ISTH) (211).....	59

## **Liste des abréviations**

AAT : alpha1-antitrypsine

AT : antithrombine

AVC : accident vasculaire cérébral

BK : bradykinine

C1-inh : C1-inhibiteur

CIVD : coagulation intravasculaire disséminée

EN : élastase neutrophile

FT : facteur tissulaire

HELLP : *Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet counts*

IH : injection hydrodynamique

ISTH : *International Society on Thrombosis and Haemostasis*

JAAM : *Japanese Association for Acute Medicine*

KALL : kallikréine

KHPM : kininogène de haut poids moléculaire

LPC : ligature et ponction caecale

LPS : lipopolysaccharide

MIP-1  $\alpha$  : *macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*

NETs : *Neutrophil Extracellular Traps*

PAR : *Protease Activated Receptors*

PC(a) : protéine C (activée)

PK : prékallikréine

PL : phospholipides

PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate

PS : protéine S

PZ : protéine Z

RANTES : *Regulated upon Activation, normal T cell Expressed and Secreted (CCL5)*

rhZPI : ZPI recombinant humain

SAPL : Syndrome des antiphospholipides

TAM : *Tumor-associated macrophage*

TFPI : *Tissue Factor Pathway Inhibitor*

TLR : *Toll-like Receptor*

TM : thrombomoduline

TVP : thrombose veineuse profonde

ZPI : *Protein Z-dependent Protease Inhibitor*, inhibiteur dépendant de la protéine Z

## Introduction

L'inhibiteur dépendant de la protéine Z (ZPI) est un inhibiteur physiologique de la coagulation qui inhibe les facteurs Xa (FXa) et XIa (FXIa). L'inhibition du FXa nécessite la protéine Z (PZ), un cofacteur vitamine K-dépendant, qui permet de rapprocher le ZPI du facteur Xa fixé sur les phospholipides. Chez l'Homme, la PZ circule sous forme de complexe équimolaire avec le ZPI, avec un excès de ZPI. Le rôle physiologique du complexe PZ/ZPI est actuellement mal défini, les études analysant les conséquences d'un déficit en PZ ou ZPI n'étant pas univoques. Les souris déficitaires en ZPI et PZ sont viables toutefois il a été observé une augmentation de la mortalité intra-utérine chez les souris déficitaires en ZPI. Par contre, dans des modèles expérimentaux de thrombose, une augmentation des phénomènes thrombotiques est observée chez les souris déficitaires en ZPI et PZ par rapport aux souris « sauvages ». Récemment, dans un modèle d'inflammation aigüe chez la souris, il a été établi que le ZPI est une protéine de l'inflammation, L'observation d'une augmentation du taux plasmatique de ZPI après chirurgie ou chez des sujets atteints de cancers inflammatoires a confirmé que le ZPI est aussi une protéine de l'inflammation chez l'Homme (1,2).

L'inflammation est un moyen de se défendre contre les agressions de l'organisme, et l'augmentation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation permet le plus souvent de réduire l'agression de l'organisme (3). Nous avons donc recherché si le ZPI avait la capacité à diminuer la réponse inflammatoire, notamment en ce qui concerne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Comme il existe un excès de sécrétion de cytokines dans le sepsis, nous avons donc étudié dans un modèle murin si le ZPI était capable de réduire la production de cytokines en réponse à l'injection de lipopolysaccharide. De plus, dans le sepsis, l'activation des polynucléaires neutrophiles, entraîne la production de *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), qui peuvent cliver des inhibiteurs de la coagulation (comme le TFPI) contribuant ainsi aux phénomènes thrombotiques observés dans le sepsis (4). Dans une seconde partie de ce travail, nous avons donc montré que l'activité du ZPI était très vite diminuée par les NETs, en raison de différentes coupures protéolytiques, vraisemblablement dues à l'action de l'élastase neutrophile associée aux NETs.

Enfin, dans une dernière partie de ce travail, en collaboration avec le service de réanimation du CHU de Strasbourg, nous avons étudié les variations de PZ et ZPI chez des patients atteints de choc septique. Si la PZ est diminuée au diagnostic, nous avons observé une

augmentation importante de ZPI, plus importante encore que celle décrite en chirurgie ou dans les cancers, mais toutefois à un taux plus faible que celle nécessaire pour induire *in vitro* une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires.

# **Rappels bibliographiques**



# I- Place du système PZ/ZPI dans la coagulation

## 1) L'hémostase et la coagulation

L'hémostase est l'ensemble des mécanismes physiologiques qui concourent à la prévention et à l'arrêt des saignements, elle est constituée par l'hémostase primaire et la coagulation plasmatique, l'étape ultime étant la fibrinolyse, qui permet la dégradation du caillot formé. S'il est classique de séparer ces trois étapes, il faut bien souligner qu'*in vivo*, les mécanismes sont concomitants.

En présence d'une lésion vasculaire, il y a une vasoconstriction réflexe et l'activation de l'hémostase primaire, initiée par l'adhésion des plaquettes au site de lésion. Les plaquettes vont adhérer au sous-endothélium directement ou par l'intermédiaire du facteur Willebrand. L'adhésion des plaquettes est accompagnée d'un changement de forme majeur permettant l'exposition des phospholipides chargés négativement, ainsi que la formation de pseudopodes facilitant leur ancrage. Ensuite, les plaquettes vont s'activer, sécréter le contenu de leurs granules et synthétiser des dérivés de l'acide arachidonique, puis s'agréger et former le clou plaquettaire. (5)

Simultanément à la formation du clou plaquettaire, la coagulation plasmatique est déclenchée conduisant à la génération de thrombine permettant la formation d'un réseau de fibrine. La coagulation est une cascade d'activations enzymatiques au cours desquelles les précurseurs inactifs d'enzymes, appelés zymogènes, sont activés pour acquérir des propriétés protéolytiques ou catalytiques. Deux voies ont été identifiées : la voie du facteur tissulaire et la voie de la phase contact.

### a) La voie du facteur tissulaire

Dans cette voie, qui correspond au mécanisme physiologique, la coagulation est initiée par l'exposition du facteur tissulaire (FT) au flux sanguin. Le FT sert de récepteur au facteur VII (FVII), qui devient actif (FVIIa) et clive le facteur X (FX) en FXa. Le Facteur VIIa peut également activer le facteur IX (antihémophilique B) en IXa, qui a la capacité d'activer le FX. Le FXa clive à son tour le facteur II (prothrombine) en FIIa appelé plus habituellement thrombine. Les premières molécules de thrombine formées vont amplifier la cascade de la coagulation, notamment en clivant le facteur V (FV) et le facteur VIII (antihémophilique A).

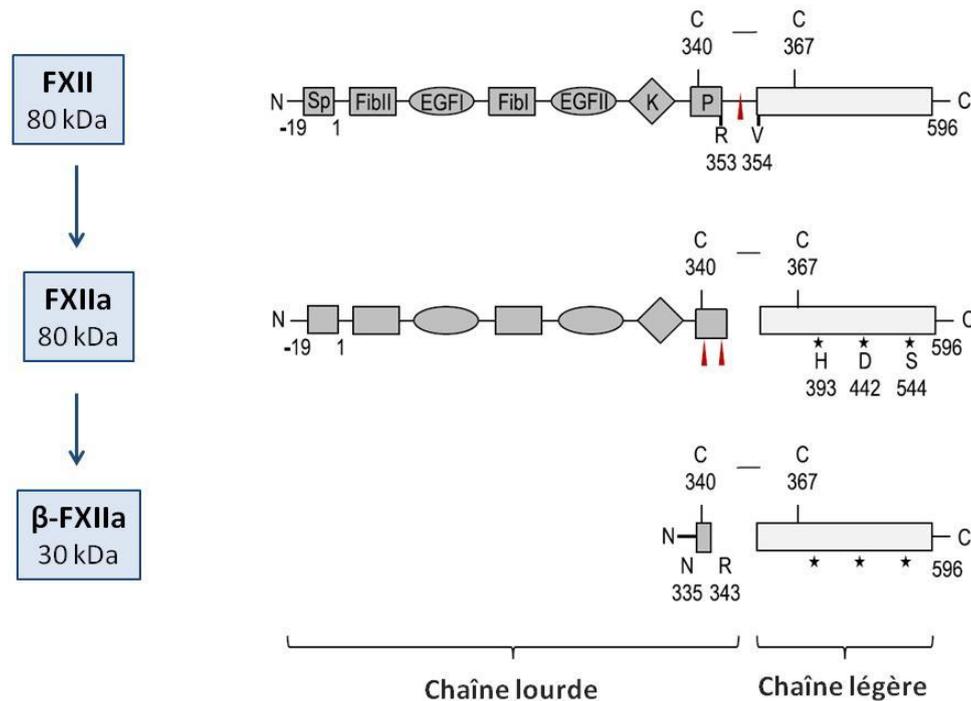
Cette génération de FVa et FVIIIa va aboutir à la formation de complexes enzymatiques, la tenase (constituée des facteurs antihémophiliques A et B, des phospholipides et de calcium) et la prothrombinase, constituée des FVa, FXa, phospholipides et calcium. La formation de ces complexes enzymatiques augmente d'un facteur 1000 environ la vitesse de la coagulation et permet la génération « explosive » de thrombine permettant la formation de fibrine et ainsi du thrombus fibrino-plaquettaire. La cascade de la coagulation se déroule à la surface des phospholipides, soit tissulaires, soit plaquettaires. En effet, les facteurs vitamine K-dépendants (FII, FVII, FIX et FX) localisent la coagulation à la surface des phospholipides anioniques (essentiellement la phosphatidylsérine), en se fixant sur les phospholipides par l'intermédiaire d'ions calcium. La thrombine joue ainsi un rôle majeur, car elle permet d'augmenter la quantité de phospholipides nécessaires à la coagulation, en activant les plaquettes. Elle active les cofacteurs V et VIII (rétro-contrôle positif, mais elle active également le facteur XI (FXI), qui s'insère dans cette cascade d'amplification en activant le FIX (6).

#### b) La voie de la phase contact

La coagulation peut aussi être initiée par l'activation du FXII, dans la voie dite « système contact » ou « voie intrinsèque », par opposition à l'initiation par le FT dite classiquement « voie extrinsèque ». Cette initiation par le FXII activé (FXIIa) n'est pas fonctionnelle dans les conditions physiologiques, mais se produit dans des circonstances pathologiques ou lorsque le sang est en contact avec des surfaces non physiologiques. Cette voie implique trois sérine-protéases : le FXII, le FXI et la prékallikréine (PK), ainsi que le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) qui est un cofacteur non enzymatique.

Le FXII (ou facteur Hageman) est une molécule monocatenaire qui circule dans le plasma à une concentration de 40 µg/mL (375 nM), sa demi-vie est de 50 à 70 heures. C'est une protéine d'environ 80 kDa (7). Le FXII est activé en présence d'une surface électronégative (auto-activation) entraînant un changement de conformation, qui est stabilisée par l'ion zinc ( $Zn^{2+}$ ), ou par un clivage par la kallikréine (KALL) (hétéro-activation). L'activation du FXII en FXIIa (ou  $\alpha$ FXIIa) conduit à la formation d'une protéine constituée d'une chaîne lourde (52 kDa) et d'une chaîne légère (28 kDa) liées par un pont disulfure. La chaîne légère porte l'activité enzymatique, qui permettra le clivage de la PK et du FXI, tandis que la chaîne lourde permet sa fixation aux surfaces électronégatives. L' $\alpha$ FXIIa peut encore être clivé par la

KALL, conduisant au fragment  $\beta$ -FXIIa, qui garde son activité protéolytique envers la PK mais perd sa faculté à se lier aux surfaces électro-négatives (Figure 1) (8).



**Figure 1 : Représentation schématique de l'activation du FXII.**

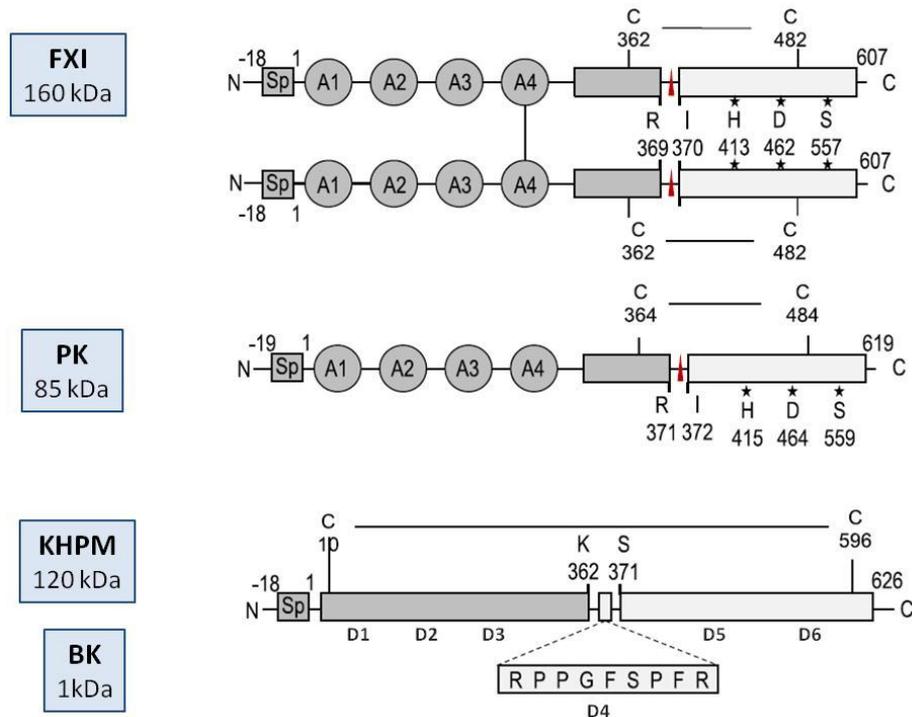
*L'auto-activation et l'activation par la KALL du FXII se fait par clivage de la liaison peptidique R353-V354. Le FXIIa ainsi formé est composé d'une chaîne lourde et une chaîne légère, reliée par un point disulfure. La chaîne légère porte le triade catalytique (en astérisque). Un clivage du FXIIa au niveau des liaisons peptidiques R343-L344 et R334-N335 par la KALL conduit au  $\beta$ -FXIIa. Ce dernier perd sa faculté à se lier aux charges négatives en libérant sa chaîne lourde, mais garde son potentiel d'activation de la PK (9).*

Le FXI est un autre facteur du système contact, il circule dans le plasma sous forme d'homodimère, chaque sous-unité étant d'environ 80 kDa, liées par un pont disulfure. Sa concentration plasmatique est de 5  $\mu$ g/mL (30 nM). Le FXI circule dans le plasma sous forme de complexe non covalent avec le KHPM, et deux molécules de KHPM sont liées à une molécule de FXI. Chaque sous-unité du FXI peut être clivée par la thrombine ou le FXIIa, donnant une chaîne lourde d'environ 50 kDa et une chaîne légère de 30 kDa portant le domaine catalytique, reliées par un pont disulfure (Figure 2). Le terme FXIa désigne le clivage des deux sous-unités (9,10). Le FXIa a comme substrat principal le FIX (10). En 2016, dans un système purifié, il a été montré que le FXIa peut aussi activer le FXII, ce qui a été confirmé dans un modèle murin (11). Ainsi, le FXIa s'ajouterait à la boucle d'amplification de la production de FXIIa.

La PK est une glycoprotéine de 85 kDa, elle circule dans le plasma sous forme de monomère à une concentration de 50 µg/mL (490 nM). La PK a 58 % d'homologie de séquence avec le FXI, et comme ce dernier, la majorité de PK (environ 75 %) circule sous forme de complexe non covalent avec le KHPM (ratio 1:1). La PK est le précurseur de la KALL, qui résulte de son clivage par le FXIIa ou  $\beta$ -FXIIa, et est constituée de deux fragments de 52 et 33 kDa liés par un pont disulfure (Figure 2). La KALL amplifie la génération de FXIIa et peut cliver le KHPM pour la libération de bradykinine (BK) (9,12).

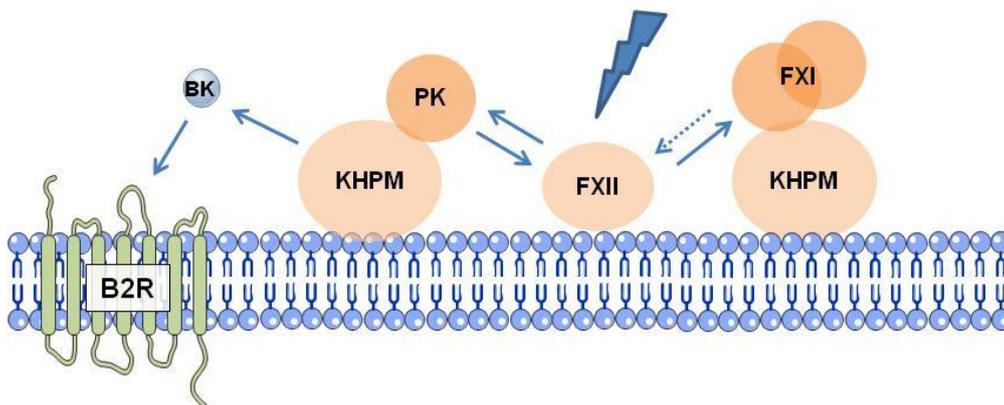
Le KHPM est une glycoprotéine non enzymatique de 120 kDa, et circule à une concentration plasmatique de 80 µg/mL (670 nM). Le KHPM est constitué de 6 domaines D1 à D6, dont le clivage par la KALL conduit à la formation de KHPM activé (KHPMa), constitué de deux chaînes de 64 et 56 kDa reliés par un pont disulfure (D1-D3 et D5-D6), et permet la libération de BK (D4) (Figure 2) (9,12). Le domaine D6 est le site de liaison avec le FXI et la PK (13), tandis que D3 et D5 permettent la liaison du KHPM aux récepteurs cellulaires (cellules endothéliales, plaquette et les neutrophiles). La liaison de KHPM à la surface des cellules est dépendante de la présence d'ions zinc (12).

En somme, l'auto-activation du FXII est observée en présence d'une surface chargée négativement (par exemple le verre ou les circuits de circulation extra-corporelle) ou en présence de molécules physiologiques comme les acides nucléiques ou le collagène, ou encore par les agents pathogènes comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries (14). La présence d'un de ces activateurs conduit à un changement de conformation du zymogène FXII, conduisant à la génération d'une petite quantité de FXIIa. Le FXIIa active la PK en KALL. La KALL active rapidement d'autres molécules de FXII entraînant une boucle d'amplification de la production de FXIIa, ainsi de sa propre production (Figure 3) (8). Le complexe FXII/KHPM/PK est localisé à la surface des cellules endothéliales et assemblé grâce à la liaison du FXII et de KHPM au récepteur de la protéine du complément C1q (gC1q-R) (15). D'autres récepteurs favorisent la formation de ce complexe, notamment le récepteur de l'urokinase (uPAR) et la cytokératine 1 (CK1) (Figure 4) (12,16). Le FXIIa va ensuite cliver le KHPM et conduire à la libération de BK, un peptide de 9 acides aminés. La BK régule différents processus physiologiques et pathologiques, comme la libération de monoxyde d'azote et la vasodilatation, en se fixant notamment à son récepteur B2R (17).



**Figure 2 :** Structures schématiques du facteur XI (FXI), de la prékallikréine (PK) et du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM).

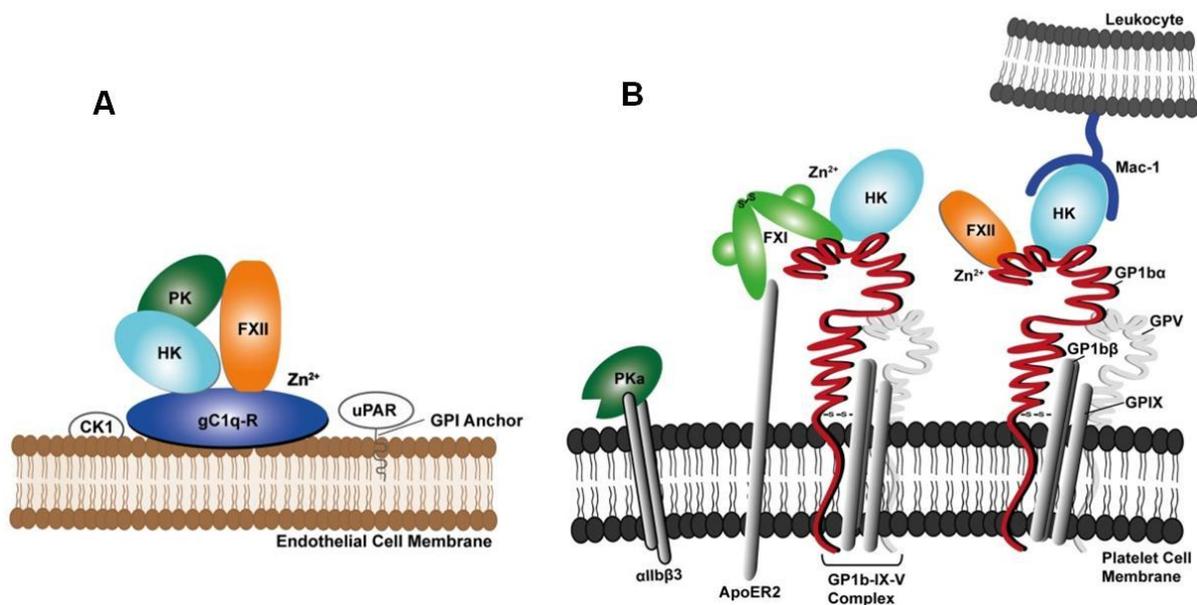
Le FXI est formé d'un dimère comprenant deux chaînes liées de manière covalente par un pont disulfure sur le domaine A4. Il est activé par un clivage protéolytique de la liaison R369-I370 par le FXIIa. Les acides aminés de la triade catalytique sont portés par la chaîne légère (astérisque). Le FXIIa clive la PK au niveau de la liaison peptidique R371-I372 et conduit à la formation de kallikréine (KALL), composée de deux chaînes lourde et légère liées par un pont disulfure. La KALL peut cliver le KHPM au niveau des liaisons R370-S371 et K362-R363 et entraîne la libération de la bradykinine (BK) (9).



**Figure 3 :** Schéma simplifié des interactions entre les facteurs de la voie du système contact.

Les protéines impliquées dans la voie du système contact, facteur XII (FXII), kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) et prékallikréine (PK) s'assemblent à la surface des cellules. L'activation du FXII permet l'activation du facteur XI (FXI). Simultanément, le FXIIa active la PK et permet la libération de bradykinine (BK) à partir de KHPM. La BK via le récepteur B2R entraîne une cascade de signalisation (11,18).

Le FXIIa peut aussi activer le FXI en FXIa, et inversement, le FXIa pourrait amplifier l'activation du FXII. L'assemblage du complexe FXII/KHPM/FXI est retrouvé à la surface des plaquettes en se fixant sur le complexe glycoprotéique GP1b-IX-V. D'autres récepteurs plaquettaires interagissent avec les protéines de la voie du système contact, comme le récepteur des apolipoprotéines E (ApoER2) (19) qui permet la liaison du FXI, ou l' $\alpha$ IIb $\beta$ 3 qui permet la fixation de la KALL (20) (Figure 4). Les polyphosphates (polyP) libérés par les plaquettes sont décrits comme des activateurs endogènes du FXII (21). Par la suite, le FXIa active le FIX en FIXa, et fait ainsi le lien entre voie extrinsèque et intrinsèque de la coagulation.



**Figure 4 : Interactions des protéines du système contact avec différents récepteurs cellulaires.**

(A) Assemblage du facteur XII (FXII), du kininogène de haut poids moléculaire (HK) et de la prékallikréine (PK) à la surface des cellules endothéliales, nécessitant le récepteur de la protéine C1q (gC1q-R), le récepteur de l'urokinase (uPAR), et la cytokératine 1 (CK1). (B) Le complexe glycoprotéique GPIb-IX-V interagit avec le FXII, KHPM et le FXI. La liaison de HK au récepteur « macrophage-1 antigen receptor » (Mac-1) des leucocytes permet de faire un pont entre les deux types cellulaires. La kallikréine (PKa) peut se lier à l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 des plaquettes activées (12).

Les protéines de la voie du système contact peuvent aussi s'assembler à la surface des leucocytes. Le principal récepteur impliqué dans cette liaison est le *macrophage-1 antigen* (Mac-1, CD11b/CD18), retrouvé à la surface des monocytes, des macrophages, des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes NK. Cette liaison faciliterait notamment l'infiltration tissulaire des neutrophiles, suite à la production de BK (22).

Malgré son rôle important dans la formation du caillot *in vitro*, la voie du système contact n'est pas indispensable pour l'hémostase *in vivo*. En effet, un déficit en FXII chez la souris ou chez l'homme ne conduit pas à une tendance hémorragique. Par contre, les souris déficientes en FXII ont un défaut de stabilisation et formation du thrombus riche en plaquettes, suggérant que la voie du système contact jouerait un rôle dans le développement et la stabilisation du thrombus (23).

## 2) Régulation de la coagulation

Les facteurs de la coagulation sont présents en excès dans le sang. Sans mécanismes régulateurs, les mécanismes d'amplification et de propagation conduiraient à une coagulation généralisée de l'arbre vasculaire. Le flux sanguin permet de maintenir la cascade de la coagulation localisée au niveau de la brèche vasculaire, en effet il permet de limiter l'interaction des facteurs activés de la coagulation entre eux. Par ailleurs, la fibrine constitue un « piège à thrombine », celle-ci se retrouvant bloquée à l'intérieur des pores du caillot de fibrine.

En plus de ces mécanismes physiques, non spécifiques, trois principaux systèmes sont connus pour inhiber la coagulation : l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (*Tissue Factor Pathway Inhibitor* ou TFPI), le système de la protéine C (PC) et l'antithrombine (AT).

### a) Le TFPI

Le TFPI est un inhibiteur de sérine-protéase qui inhibe les phases précoces de la coagulation. Il est synthétisé majoritairement par les cellules endothéliales et 85% du TFPI de l'organisme sont liés à la surface des cellules endothéliales de la microcirculation. Il est présent dans le plasma à une concentration de 70 ng/mL (1,6 nM) et plus de 80 % du TFPI plasmatique sont associés aux lipoprotéines. Il existe deux isoformes principales de TFPI, issues d'épissages alternatifs : le TFPI $\alpha$  et le TFPI $\beta$ . Les deux isoformes sont retrouvées à la surface des cellules endothéliales et seul le TFPI $\alpha$  est localisé dans les plaquettes. Le TFPI a été identifié comme un inhibiteur du complexe FT-FVIIa, nécessitant le FXa et Ca<sup>2+</sup>. Le mécanisme d'inhibition est initié par la liaison du TFPI au FXa, puis de la formation du complexe FXa-TFPI-FT-FVIIa, au sein duquel les FXa, FT et FVIIa n'ont plus d'activité (24,25).

Il a été montré que le TFPI pouvait également inhiber directement le FXa et empêcher la formation du complexe prothrombinase. Cette inhibition n'est possible qu'avec le TFPI $\alpha$  qui, contrairement au TFPI $\beta$ , possède une région basique en C-terminal. De plus, elle serait amplifiée par la Protéine S (PS) et/ou le FV (26,27).

b) Le système de la protéine C

Ce système comprend la PC, la PS (son cofacteur) et deux récepteurs membranaires : la thrombomoduline (TM) et le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR). La PC et la PS sont deux protéines vitamine K-dépendantes, qui circulent dans le plasma à une concentration moyenne de 4  $\mu\text{g/mL}$  (70 nM) et 22  $\mu\text{g/mL}$  (320 nM) respectivement (28).

Lorsque la coagulation est activée et conduit à la génération de thrombine, cette dernière va pouvoir se fixer à la TM localisée à la surface endothéliale. Cette liaison implique l'exosite I de la thrombine, une région importante pour son activité catalytique vis-à-vis du fibrinogène, ce qui va réduire son activité procoagulante (29). De même, la PC va se fixer sur l'EPCR, ce qui la rapproche du complexe TM-thrombine et la présente sous une conformation adéquate pour être activée. La PC est activée en PCa suite à son hydrolyse par la thrombine. La vitesse de la réaction d'activation est multipliée par 20 lorsque la PC est fixée à l'EPCR (30).

La protéine C activée (PCa) est ensuite capable de dégrader par protéolyse les FVa et FVIIIa de la coagulation. Cette activité catalytique est potentialisée par la PS, dont 60-70 % circule sous forme liée à une protéine de transport du complément, la *C4b-binding protein* (C4bBP). Seule la fraction libre joue le rôle de cofacteur de la PCa. L'interaction entre la protéine S et la PCa semble réduire la distance entre le site actif de la PCa et la membrane phospholipidique, et permet de réorienter le site actif par rapport aux sites de clivage au niveau des FVa et FVIIIa (31).

c) L'antithrombine

L'AT est synthétisée au niveau hépatique et circule à une concentration plasmatique moyenne de 150  $\mu\text{g/mL}$  (2,57  $\mu\text{M}$ ) (32). Deux isoformes d'AT sont retrouvées dans le plasma : l'isoforme  $\alpha$  avec 4 chaînes N-glycanes (58 kDa) qui représente 90% de l'AT circulante, et l'isoforme  $\beta$  avec 3 chaînes N-glycanes (56 kDa). L'AT appartient à la superfamille des serpines (*Serine Protease Inhibitors*) et possède à son extrémité une boucle réactive lui permettant de former un complexe enzyme-inhibiteur covalent irréversible.

Contrairement à ce que son nom laisse penser, les activités anticoagulantes de l'AT ne se limitent pas à l'inhibition de la thrombine, elle est capable d'inhiber différentes sérine-protéases de la coagulation dont le FXa, le FIXa et le FXIa (33). Elle forme un complexe covalent inactif avec l'enzyme (stoechiométrie 1/1), permettant de bloquer le site catalytique de l'enzyme cible.

L'activité inhibitrice de l'AT envers les sérines-protéases est augmentée au moins d'un facteur 1000 en présence d'héparine. L'héparine est constituée d'une unité pentasaccharidique minimale pour assurer sa liaison à l'AT. Ce pentasaccharide est aussi retrouvé sur les glycosaminoglycannes (GAG) polysulfatés à la surface des cellules endothéliales (34).

#### d) L'inhibition de la voie du système contact

L'activation du système contact peut être régulée par le gC1q-R, car ce récepteur est nécessaire pour l'assemblage des facteurs de la voie du système contact à la surface des cellules endothéliales. Cependant, la majorité des gC1q-R se trouve dans le cytoplasme ou dans les mitochondries, ils se retrouvent à la surface membranaire seulement après activation des cellules endothéliales (35,36). Parmi ces activateurs ont été décrits les complexes immuns, les virus ou bactérie (37), par ailleurs les cytokines pro-inflammatoires et le LPS augmentent l'expression de gC1q-R par les cellules endothéliales (38). Une fois exprimé, le gC1q-R est aussi un activateur endogène du FXII (15).

La simple présence de gC1q-R n'est pas suffisante pour le recrutement du FXII à la surface des cellules endothéliales, elle nécessite la présence de  $Zn^{2+}$ , à des concentrations allant jusqu'à 50  $\mu M$  (39). La concentration plasmatique du  $Zn^{2+}$  est comprise entre 10 et 20  $\mu M$ , et sachant qu'une grande partie est liée à l'albumine, il ne reste qu'environ 0,5  $\mu M$  de  $Zn^{2+}$  libre. Il a été montré que l'excès de  $Zn^{2+}$  provenait des cellules endothéliales et des plaquettes activées (40).

Le C1-inhibiteur, une protéine appartenant à la superfamille des serpins, permet l'inhibition du FXIIa, de la KALL et du FXIa. Son activité inhibitrice est potentialisée par les glycosaminoglycannes. C'est une glycoprotéine formée de 478 acides aminés, avec un poids moléculaire d'environ 104 kDa, et circulant dans le plasma approximativement à 1,8  $\mu M$ . Comme c'est une protéine de l'inflammation, sa concentration physiologique peut être multipliée par deux dans des conditions inflammatoires (41).

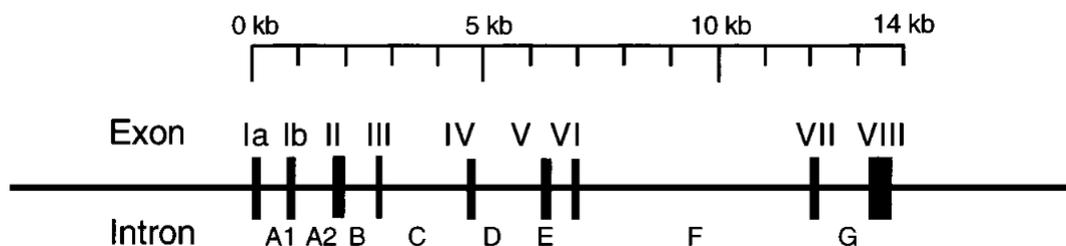
### 3) Régulation de la coagulation par le système Protéine Z et ZPI

#### a) La Protéine Z (PZ)

C'est une protéine vitamine K-dépendante découverte par Prowse et Enouf en 1977 dans le plasma bovin. Comme c'était la dernière protéine vitamine K-dépendante éluee par chromatographie échangeuse d'anions, elle a été nommée « Z ». Chez l'Homme, l'équivalent de la PZ bovine a été isolé en 1984 (42).

Le gène de la protéine Z est porté par le chromosome 13, sur la région 13q34, à côté des gènes codant le FVII et le FX. C'est un gène de 14 kilobases, comportant un promoteur de 389 paires de base, 8 exons avec un épissage alternatif de l'exon 1, et une extrémité en 3' de 275 paires de base (43). En 2001, quatorze polymorphismes du gène codant la PZ ont été identifiés. Trois autres polymorphismes ont été décrits en 2004 et la plupart de ces polymorphismes sont directement liés à la concentration plasmatique de la PZ (44). Les polymorphismes les plus étudiés sont :

- Le polymorphisme A13G situé dans le promoteur du gène de la PZ
- Le polymorphisme G42A situé dans l'intron C du gène de la PZ
- Le polymorphisme G103A situé dans l'intron A du gène de la PZ
- Le polymorphisme G79A situé dans l'intron F du gène de la PZ



**Figure 5 : Représentation schématique du gène de la protéine Z (PROZ) (43).**

La protéine Z humaine est constituée de 360 acides aminés, elle a 59 % d'homologie avec la PZ bovine qui est composée de 396 acides aminés (45). La PZ bovine a un site d'interaction avec la thrombine qui favorise sa liaison aux phospholipides, cette interaction PZ-thrombine est possible grâce aux 36 acides aminés carboxy-terminaux supplémentaires présents dans la PZ bovine. En revanche, la PZ humaine a une faible affinité pour la thrombine (46). Inversement, la thrombine peut cliver la PZ humaine au niveau de l'arginine en position 43

(R43) et induire la perte de son domaine Gla, faisant passer son poids moléculaire de 62 à 56 kDa et la rendant inactive (47).

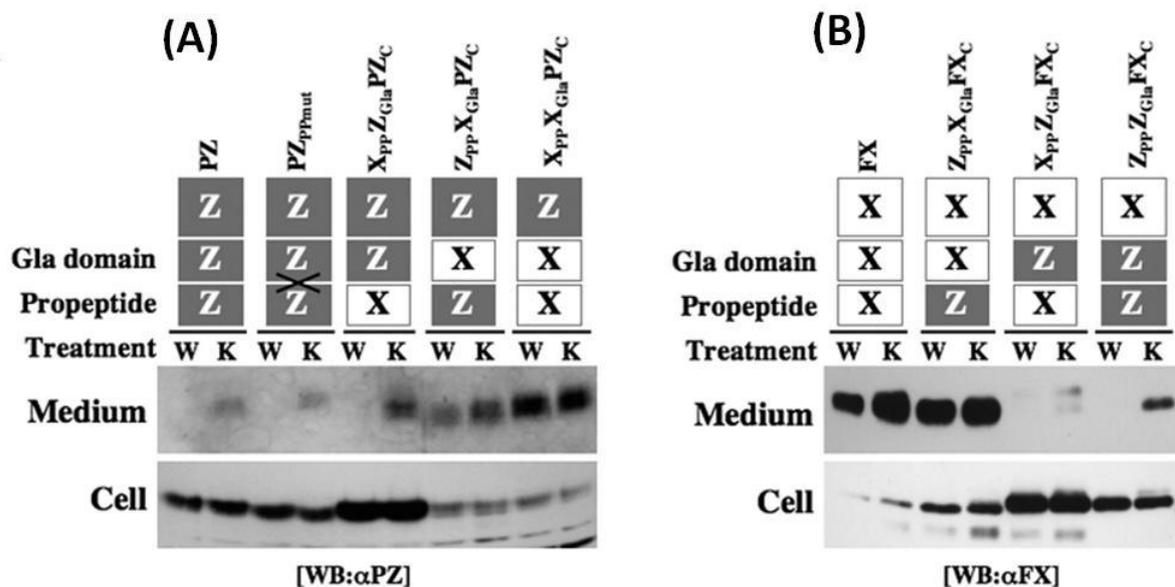
La structure de la PZ, à partir de sa partie N-terminale, peut être divisée en un domaine riche en acides  $\gamma$ -carboxyglutamique (Gla), deux domaines *epidermal growth factor-like* (EGF) et un domaine *serine protease-like*. Sa structure moléculaire est ainsi très proche des autres facteurs vitamine K-dépendants de la coagulation comme les facteurs VII, IX, X et la PC. Contrairement à ces sérine-protéases, la PZ n'a pas les résidus histidine et sérine habituellement présents au niveau de la région du site actif. Parmi la triade histidine (H), sérine (S) et acide aspartique (D) des sérine-protéases, seul D est conservé en position 221 dans la PZ ; H et S étant remplacées respectivement par une lysine (K) en position 178, et par un D en position 313, ce qui indique que la PZ humaine ou bovine n'est pas un zymogène de sérine protéase (48).



**Figure 6 : Représentation schématique de la structure de la Protéine Z (49).**

La distribution de la concentration plasmatique de la PZ est très large dans la population générale, variant entre 0,63  $\mu\text{g/mL}$  et 5,67  $\mu\text{g/mL}$  dans une population de 455 volontaires sains. Elle est très sensible à un traitement par les anti-vitamine K, effondrée (entre 1 et 16 % de la normale) après 6 mois de traitement équilibré à la warfarine (47). Cette diminution majeure de la PZ, plus importante que celle des autres facteurs vitamine K-dépendants, semble être due à la structure de son domaine Gla. L'importance du domaine Gla dans la sécrétion de la PZ a été montrée par l'analyse de deux mutations dans cette région de la PZ. La mutation E30Q a été observée chez des patients ayant un déficit en PZ (50). L'étude de l'expression de cette mutation dans les cellules rénales d'hamster (*Baby Hamster Kidney Cells, BHK cells*) a montré que non seulement cette mutation limite la sécrétion de ce variant, mais qu'elle peut aussi inhiber la sécrétion de PZ non mutée. De façon similaire, la substitution du résidu Gla-30 par une lysine (E30K) entraîne un défaut de sécrétion de la PZ (51). L'importance du domaine Gla pour la sécrétion de la PZ a été montrée par une autre approche grâce à l'utilisation de protéines chimères (Figure 7). La sécrétion de PZ est abolie

en absence de vitamine K, ce qui n'est pas le cas pour la sécrétion du facteur X. De même, la warfarine inhibe la sécrétion de PZ tandis que celle du FX est fortement réduite. La construction d'une chimère de la PZ avec le domaine Gla du FX augmente sa sécrétion et diminue sa sensibilité à la warfarine, alors qu'inversement, une chimère du FX avec le domaine Gla de la PZ n'est plus secrétée en absence de vitamine K et devient très sensible à la warfarine, ce qui montre, de façon élégante, l'importance de l'intégrité du domaine Gla dans la sécrétion de la PZ (52). Enfin, comme le taux de vitamine K plasmatique peut varier considérablement et dépend de l'alimentation, il a été suggéré que la large répartition des taux plasmatiques de la PZ dans la population pourrait être corrélée aux taux de vitamine K.



**Figure 7 : Importance du domaine Gla pour la sécrétion de la PZ.**

Différentes constructions de chimère entre les domaines de la PZ (en gris) et du FX (en blanc) ont été produites, mentionnées en haut de l'image. Les constructions ont été transfectées dans des cellules HEK293 et les cellules ont été incubées avec de la warfarine (W) ou la vitamine K (K). Puis le milieu de culture et le lysat cellulaire ont été soumis à une électrophorèse et révélés par un anticorps anti-PZ (A) ou anti-FX (B) (52).

La PZ est sécrétée principalement par les cellules hépatiques (53), mais de la PZ a été identifiée par un marquage immunologique dans les plaques d'athérosclérose (54), suggérant que la PZ peut aussi être sécrétée par les cellules endothéliales et/ou les cellules musculaires lisses. Vasse et coll. ont montré que les cellules de cordons ombilicaux humains (HUVEC) et une lignée de cellules capillaires (HMEC), représentant respectivement la macro- et la micro-circulation, sécrétaient de la PZ. En effet, la présence d'ARNm de la PZ est détectée dans ces 2 types cellulaires en culture et on peut observer un marquage de PZ par immunohistochimie

sur les cellules endothéliales d'artère ou de veine. En revanche, l'inhibiteur dépendant de la protéine Z (ZPI), cofacteur de la PZ, n'est pas détecté, ce qui suggère que le marquage immunologique observé ne correspond pas à un dépôt de PZ plasmatique, puisque la PZ circule dans le plasma sous forme de complexe avec le ZPI (55). Toutefois, la quantité de PZ produite par les cellules endothéliales est faible par rapport à celle produite par les cellules hépatiques puisque le taux de PZ diminue de manière importante chez les patients ayant des maladies hépatiques (53).

b) L'inhibiteur dépendant de la protéine Z (ZPI)

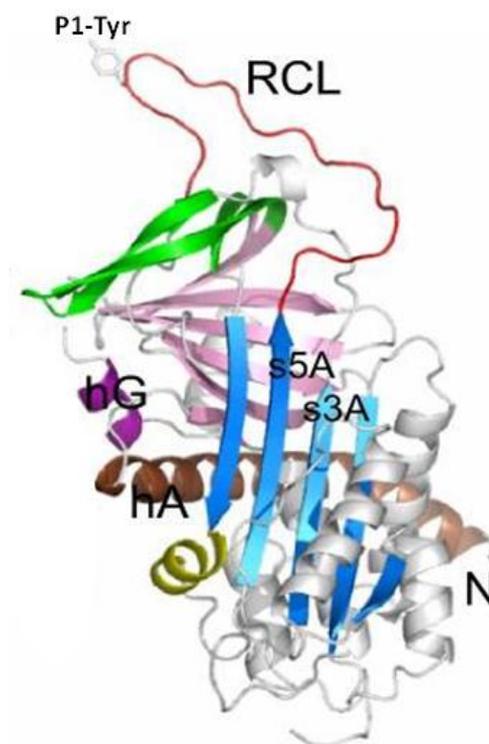
Comme décrit précédemment, la PZ, contrairement aux autres facteurs vitamine K-dépendants de la coagulation n'a pas d'activité enzymatique et son implication dans la coagulation n'était envisagée qu'en raison de ses homologies de structure avec d'autres facteurs de la coagulation. Cependant, en 1998, Han et coll. ont montré que l'activité procoagulante du FXa était réduite de façon dose-dépendante lorsqu'on rajoutait des concentrations croissantes de PZ dans un plasma appauvri en PZ. Cette inhibition requiert la présence de calcium et de phospholipides procoagulants. Par ailleurs, un prétraitement par la thrombine, clivant la PZ au niveau de R43, et séparant le domaine Gla du reste de la molécule annule l'action inhibitrice sur le FXa. Ils ont ainsi suggéré l'existence d'une protéine plasmatique responsable de l'inhibition du FXa qu'ils ont nommé : « inhibiteur dépendant de la protéine Z » communément appelé ZPI pour « *Protein Z-dependent Protease Inhibitor* » (56).

L'ADN codant le ZPI est porté par le chromosome 14q32, il fait 2,44 kB et contient 6 potentiels codons ATG initiateurs de lecture. Les 4 premiers codons ATG permettent d'obtenir respectivement 11, 22, 3 et 52 acides aminés avant de rencontrer un codon stop. Un début de lecture au cinquième ATG rajouterait 40 acides aminés à la protéine mature, par contre initier la lecture au sixième ATG suffit pour l'expression du ZPI. En somme, l'ADN codant pour le ZPI contient 1335 pb, et génère une protéine de 444 acides aminés dont 21 acides aminés constituant le peptide signal. Cinq potentiels sites de N-glycosylations sont présents, en position 15, 159, 176, 274 et 417 (57).

Pour le gène codant le ZPI, deux polymorphismes nucléotidiques ont été identifiés par Van de Water et coll. en 2004, induisant un codon stop après les résidus R67 et W303 (58). Ces 2 polymorphismes ont dans un premier temps été décrits comme liés à l'apparition de

thromboses veineuses profondes (TVP) (58,59). Ces premiers résultats ont été suivis d'autres études contradictoires, et une méta-analyse portant sur 5000 patients a exclu un lien entre les polymorphismes R67X et W303X et la survenue de thromboses veineuses (60).

Le ZPI appartient à la superfamille des serpins et est également nommé « serpine A10 ». La séquence d'acides aminés composant le ZPI a de 25 à 35% d'homologie avec les autres serpins, comme l' $\alpha$ 1-antitrypsine (AAT), l'AT ou la protéase nexine-1. Sa structure primaire contient 40 des 51 résidus décrits comme essentiels pour la structure tertiaire des serpins. La partie C-terminale présente une grande analogie avec les autres serpins, cependant la séquence N-terminale contient un domaine très acide qui la différencie des autres serpins (57). La détermination par cristallographie de la structure du ZPI a pu confirmer cette appartenance à la superfamille des serpins, avec la présence de 3 feuillets  $\beta$  et l'exposition d'une boucle réactive (Figure 8) (61). L'alignement de séquence a permis d'identifier que la tyrosine 387 est le résidu  $P_1$  de son centre actif. La production d'un variant Y387A a permis de confirmer cette hypothèse, en effet le variant Y387A perd son activité anti-FXa en présence de PZ, de calcium et de phospholipides (57) et son activité anti-FXIa (62).



**Figure 8 : Structure tridimensionnelle du ZPI, archétype des serpins.**

*Le ZPI a la structure type d'une serpine avec 3 feuillets  $\beta$  (bleu ciel, bleu et vert) et l'exposition d'une boucle réactive (RCL, rouge). Le résidu P1-Tyr en position 387 est représenté sur la boucle réactive (61).*

Le ZPI a 78 % d'homologie avec les acides aminés de la protéine rasp-1 du rat, ce qui a conduit à considérer le ZPI comme l'homologue de rasp-1 chez l'Homme. Rasp-1 a été initialement caractérisé comme un gène dont la transcription augmentait de 3 à 4 fois lors d'une hépatectomie chez le rat. Il s'avère qu'il augmentait aussi chez les rats opérés témoins, sans hépatectomie, ce qui suggère que rasp-1 est une protéine de la phase aigüe de l'inflammation (57,63). Le ZPI est une protéine d'environ 72 kDa. Le gène rasp-1 code une protéine d'environ 50 kDa, la différence de masse avec le ZPI chez l'Homme serait due à la différence de glycosylation.

Le ZPI est produit au niveau des cellules hépatiques, et contrairement à la PZ, une production par les cellules endothéliales n'a pas été détectée (57) (55).

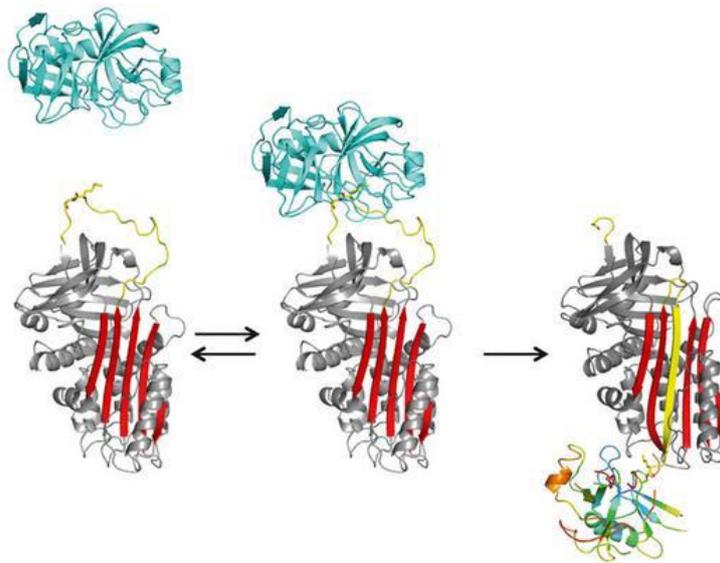
### *Inhibition du FXa par le ZPI*

En présence de PZ, de calcium et de phospholipides, le ZPI inhibe de façon très rapide le FXa. En effet la PZ accélère l'inhibition du FXa par le ZPI d'un rapport 1000 ( $t_{1/2}$  moins de 10 secondes contre 210 minutes en absence de PZ) (56) (62). La PZ se lie préférentiellement aux phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines, l'affinité de sa liaison aux deux types de phospholipides est équivalente mais synergique pour l'activité anti-FXa du complexe PZ-ZPI (64).

Comme les membres de la superfamille des serpinés, le ZPI inhibe le FXa en agissant comme un substrat suicide. Les résidus P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' (Y387-S388) sur sa boucle réactive permettent la fixation de la sérine protéase par une liaison covalente, puis la boucle réactive s'insère dans le feuillet tout en entraînant la protéase liée comme une tapette. Le changement conformationnel du complexe protéase-serpine permettra par la suite sa reconnaissance par des récepteurs responsables de sa clairance rapide hors de la circulation (65). De façon inhabituelle, le complexe PZ-ZPI se dissocie après la liaison du ZPI au FXa (66), le complexe FXa-ZPI est considérablement moins stable que les autres complexes protéase-serpinés, d'une part le complexe se sépare en SDS-PAGE (mais peut être détecté en alcaline-PAGE), et d'autre part, une étude cinétique a montré que le complexe peut se dissocier, et que l'activité inhibitrice maximale du ZPI contre le FXa est observée entre 1 et 10 minutes (67). L'interaction du ZPI avec le FXa conduit à la libération d'un peptide de 4,2 kDa par le ZPI. Comme attendu, la séquence N-terminale du peptide libéré, SMPPVIKVDPRPF, correspond à la séquence d'acides aminés suivant la Y387, confirmant ainsi le rôle du résidu P<sub>1</sub> comme site actif (62).

La stœchiométrie de l'inhibition du FXa par le ZPI en présence de PZ, calcium et phospholipides est de  $2,8 \pm 0,2$  moles de ZPI par mole de FXa, ce qui signifie que pour 3 molécules successives réagissant avec le FXa, 2 molécules ont été clivées comme substrat et 1 molécule a permis l'inhibition (66).

Le coefficient d'inhibition du FXa par le ZPI en présence de ses cofacteurs (PZ, phospholipides et  $\text{Ca}^{2+}$ ) est de  $9,1 \pm 0,2 \times 10^6$  (67). En comparaison, celui de l'AT (en présence d'héparine non fractionnée) envers le FXa est de  $6,6 \times 10^6$  (68), mais sachant que l'AT est plus concentrée que le complexe PZ/ZPI dans la circulation sanguine (environ 100 fois plus), on peut en déduire que l'inhibition du FXa en situation physiologique se fait principalement par l'AT.

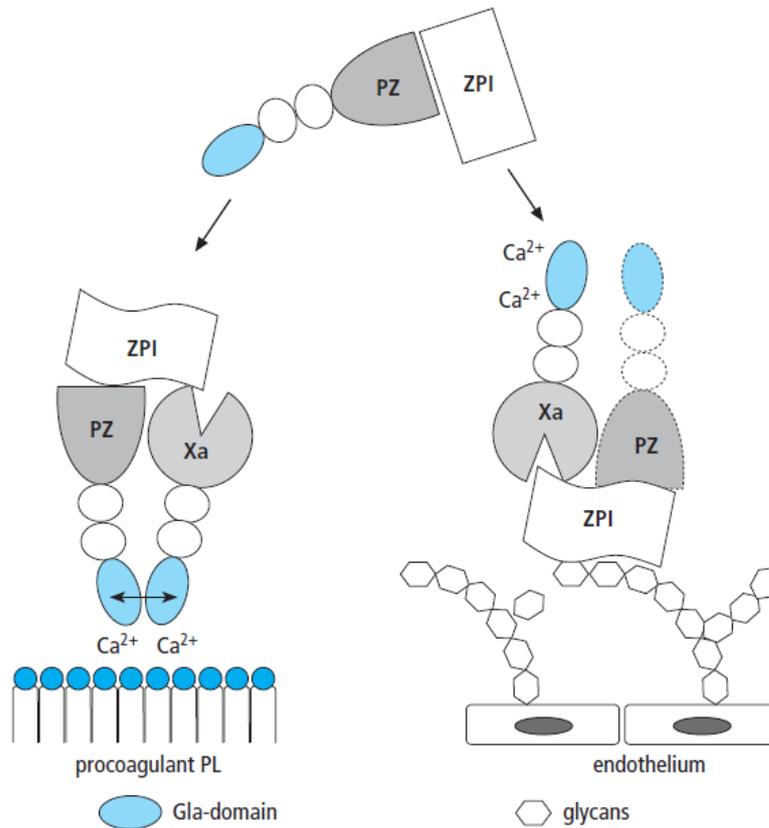


**Figure 9 : Mécanisme d'inhibition des serpins.**

*La serpine forme un complexe acyl-enzyme avec la sérine protéase (bleu), puis la boucle réactive (jaune) s'incorpore au sein du feuillet  $\beta$  (rouge) entraînant la protéase (69).*

Il a aussi été montré que l'héparine active le ZPI et accélère l'inhibition du FXa par le ZPI (70), ce qui n'est pas réellement une surprise car l'affinité du ZPI à l'héparine a été utilisée pour sa purification à partir du plasma (56). L'interaction se fait au niveau des hélices C et D du ZPI et n'implique pas la partie acide N-terminale (71). Cette potentialisation de la liaison du FXa au ZPI par l'héparine requiert au moins 18 unités saccharidiques, ne nécessite pas la présence du pentasaccharide, et s'accroît avec la longueur de la chaîne. En effet, les

héparines de bas poids moléculaire n'accélèrent la réaction d'inhibition du FXa par le ZPI que d'un facteur 8 alors que l'héparine non fractionnée l'accélère d'un facteur 100 (70). La présence d'un site de fixation pour l'héparine sur le ZPI, et donc pour les héparanes sulfates tapissant les cellules endothéliales, suggère que le ZPI peut inhiber le FXa circulant s'échappant dans la circulation sanguine. Ainsi, le ZPI pourrait inhiber le FXa fixé à la surface des phospholipides grâce à l'attachement du complexe PZ-ZPI sur les phospholipides, mais aussi le FXa libre (Figure 10).



**Figure 10 : Inhibition du FXa par le ZPI.**

*La PZ circule sous forme de complexe avec le ZPI dans le plasma. En présence de calcium et de phospholipides, le domaine Gla de la PZ interagit avec celui du FXa, potentialisant ainsi l'inhibition du FXa par le ZPI. Le ZPI aussi peut se lier aux glycosaminoglycannes à la surface des cellules endothéliales et inhiber le FXa qui se serait échappé dans la circulation (72).*

Les phospholipides étant un des cofacteurs indispensables pour l'inhibition du FXa par le ZPI, il n'est pas surprenant que l'oxydation lipidique, qui peut arriver notamment suite à un stress oxydatif, altère l'activité inhibitrice du ZPI envers le FXa. De façon surprenante, l'analyse du mécanisme par Huang et coll. a montré qu'en milieu purifié, le ZPI recombinant (rZPI) peut se lier aux PL oxydés *via* son site de liaison à l'héparine (73). Le rZPI préincubé avec les PL oxydés est incapable de se complexer avec la PZ, expliquant la perte d'activité anti-FXa. Par

contre, en présence de PZ ou d'héparine, cette liaison du ZPI aux PL oxydés n'est pas observée, et de même, l'interaction est moins évidente avec du ZPI plasmatique (73). Il est donc probable que ce phénomène se produise rarement dans des conditions physiologiques, mais est à prendre en compte dans des conditions physiopathologiques, notamment en présence d'un taux élevé de ZPI, qui alors n'est plus protégé par la PZ, puisque chez l'homme la concentration de PZ est plus faible que celle du ZPI.

### *Inhibition du FXIa par le ZPI*

Le ZPI peut aussi inhiber le FXIa mais cette inhibition ne nécessite pas la présence des cofacteurs précédemment cités (PZ, calcium et phospholipides) et n'est pas potentialisée par le KHPM. Il a de plus été montré que l'inhibition du FXIa par le ZPI est atténuée en présence de PZ, probablement en raison d'un changement allostérique du ZPI ou par un encombrement stérique. Comme pour l'inhibition du FXa, le complexe FXIa-ZPI n'est pas stable, et un clivage du ZPI est observé faisant passer sa masse moléculaire de 72 à 68 kDa (62).

L'héparine non fractionnée (0,2 U/mL) potentialise l'inhibition du FXIa par le ZPI ( $t_{1/2}$  25 secondes vs 50 secondes, et 99 % vs 93 % d'inhibition après 30min) (62). La stœchiométrie de l'inhibition du FXIa par le ZPI est de  $8,6 \pm 0,8$  mol ZPI/mol FXIa en absence d'héparine, et  $6,1 \pm 0,4$  mol ZPI/mol FXIa en présence de polysaccharides (66). Le ZPI possède une très forte affinité pour le FXIa par rapport aux autres serpinés plasmatiques (Tableau 1), cependant, la concentration plasmatique du ZPI est beaucoup plus faible que ces protéines, ce qui signifie que dans le plasma l'inhibition du FXIa serait de la même importance celles des autres serpinés. Par contre, son activité inhibitrice pourrait être importante pour un contrôle local de l'activité du FXIa.

**Tableau 1 : Constantes d'inhibition ( $K_i$ ) du FXIa plasmatique par les serpinés.**

	<b>C1-inh</b>	<b>ZPI</b>	<b>AT</b>	<b>AT + H<sub>5</sub></b>
<b><math>K_i</math> (FXIa) <math>10^3</math> (<math>M^{-1} s^{-1}</math>)</b>	1,6 $\pm$ 0,1	440 $\pm$ 20	0,3 $\pm$ 0,04	1,1 $\pm$ 0,1

*La  $K_i$  a été déterminée après incubation du FXIa (0,5 nM) avec le C1-inh (50-400 nM), ou le ZPI (10-50 nM), ou l'antithrombine (AT, 200-1000 nM)  $\pm$  pentasaccharide (H<sub>5</sub>, 2  $\mu$ M) pendant 3 à 140 min (74).*

### *Inhibition du FIXa*

En 2005, Heeb et coll. ont décrit que le ZPI peut inhiber le FIXa dans le complexe tenase (75), mais ce résultat n'a pu être retrouvé et confirmé par d'autres équipes. Quelques années plus tard, Rezaie et coll. ont démontré la particularité de la « boucle 39 » du FIXa, significativement moins acide que celle du FXa, ce qui limite son inhibition par les serpins, indiquant ainsi que l'AT est le seul inhibiteur physiologique du FIXa (76). Ceci a été confirmé en produisant une chimère de ZPI et d'AT (ZPI-AT<sup>P12-3</sup>), la boucle réactive du ZPI ayant été remplacée par celle de l'AT. L'effet inhibiteur de cette chimère sur le FIXa a été étudié : comme attendu, cette chimère inhibe le FIXa en milieu purifié, cependant, elle n'a pas d'effet sur un temps de céphaline avec activateur, car malgré sa faculté à inhiber le FIXa, le ZPI-AT<sup>P12-3</sup> est rapidement clivé par le FXIa (Cf ZPI substrat suicide du FXIa) (77).

#### c) Le complexe PZ-ZPI

### *Complexe équimolaire*

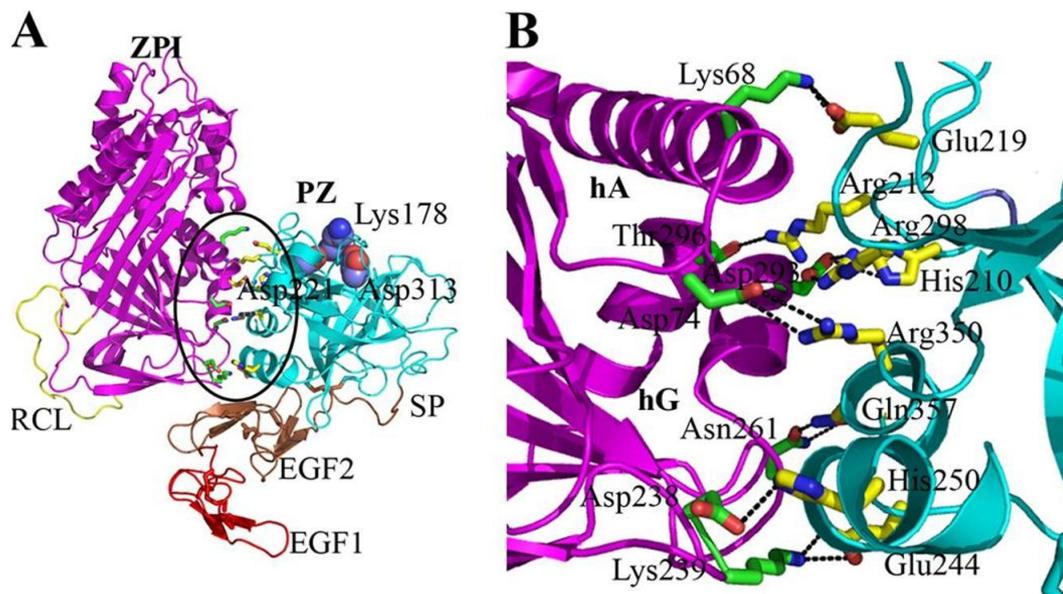
La PZ circule sous forme de complexe équimolaire avec le ZPI dans le plasma. Le complexe PZ-ZPI peut être mis en évidence par chromatographie par gel filtration du plasma, au cours de laquelle la séparation des protéines se fait en fonction de leur masse moléculaire. De la même façon, les protéines purifiées de PZ et de ZPI peuvent former un complexe après 15 minutes d'incubation, ceci ne nécessitant ni calcium ni phospholipides (78). Sachant que chez l'Homme, le ZPI est en excès par rapport à la PZ, toute la PZ est complexée au ZPI (78). Cette forte affinité entre la PZ et le ZPI est aussi retrouvée chez la souris, le complexe PZ-ZPI peut être observé sur chromatographie par exclusion de taille. Cependant c'est la PZ qui est en excès chez la souris, entraînant ainsi la présence de PZ plasmatique libre (environ 65 % de la PZ totale) et l'association de la totalité du ZPI à la PZ (79).

### *Sites d'interaction entre la PZ et le ZPI*

Deux équipes ont déterminé par cristallographie la structure du complexe PZ-ZPI (61) (67). Ces résultats ont montré que les molécules de ZPI et PZ sont liées par trois liaisons ioniques formées par 10 résidus, 6 étant situés sur la PZ (H250, D246, E244, R350, R298, et H210) et 4 sur le ZPI (K239, D238, D74, et D293), mais aussi par des liaisons hydrophobes entre les résidus L353 de la PZ, et Y240 et M71 du ZPI (Figure 11). Par la suite, Huang et coll ont identifié la présence des résidus du ZPI cruciaux pour cette liaison et aussi l'importance du domaine EGF2 de la PZ. Tout d'abord, en mutant les résidus du ZPI cités précédemment et

impliqués dans la liaison avec la PZ (remplacement des résidus par l'Alanine), ils ont dans un premier temps vérifié que les variants du ZPI avaient conservé leur capacité à inhiber le FXa et FXIa en absence de PZ. Puis dans un deuxième temps, ils ont observés que les variants D74A/D293A et D293A perdaient complètement leur liaison à la PZ, la mutation Y240A induisant une perte partielle de la liaison, les autres variants n'ayant pas d'impact sur l'interaction PZ/ZPI. Ils ont conclu que seulement deux des 6 résidus du ZPI impliqués dans sa liaison à la PZ sont cruciaux pour la formation du complexe PZ-ZPI : les résidus D293 et Y240. La production de chimères de PZ et de PC a montré l'importance du domaine EGF2 de la PZ dans sa liaison au ZPI (80).

Par cristallographie, il a été conclu que la potentialisation par la PZ de l'effet inhibiteur du ZPI sur le FXa résultait « simplement » d'un rapprochement spatial, par fixation de la PZ sur les phospholipides *via* son domaine Gla (61). Cependant, en 2010, l'addition d'un fluorophore sur différents sites du ZPI a permis de montrer que la liaison à la PZ induit une modification conformationnelle du ZPI au niveau de sa boucle réactive et de l'hélice A (67).



**Figure 11 : Sites d'interaction entre la PZ et le ZPI.**

(A) Représentation du complexe PZ/ZPI avec le ZPI en violet et sa boucle réactive (RCL) en jaune, la PZ en bleu et ses domaines EGF en rouge et marron. Les 3 acides aminés qui correspondraient à la triade catalytique d'une sérine-protéase de la PZ sont représentés : Lys178, Asp221 et Asp313. (B) sites d'interaction entre la PZ et le ZPI (67).

Une autre étude structurale a montré que la PZ se dissocie du ZPI après la formation du complexe ZPI-FXa (80). Cette observation était prévisible puisque le ZPI clivé par le FXa ou le complexe ZPI-FXa ne sont pas capables de lier la PZ (66), ce qui suggère que la PZ est un catalyseur recyclable de la réaction d'inhibition du FXa par le ZPI.

d) Relevance physiologique

*In vitro*, l'association PZ-ZPI retarde la formation de thrombine et diminue le taux de thrombine généré dans un mélange constitué de prothrombine, de FXa, de FV, de phospholipides et de calcium. En revanche, dans un mélange similaire, contenant du FVa au lieu du FV, l'effet inhibiteur du complexe PZ-ZPI n'a pas d'effet, ce qui indique que l'action du complexe PZ-ZPI sur le FXa intervient assez tôt dans la coagulation, avant l'activation du facteur V et la formation du complexe prothrombinase (62).

*Souris déficitaires en PZ et ZPI*

Pour comprendre la relevance physiologique de la PZ et du ZPI dans la coagulation, des souris déficitaires en PZ ou ZPI ont été générées. Ces souris sont viables et ne présentent aucun trouble en absence de facteurs de risque externe. Il est constaté toutefois une augmentation discrète de mortalité intra-utérine chez les souris déficitaires en ZPI (81,82). Le déficit en PZ ou ZPI est associé à une aggravation de la thrombose dans deux modèles classiquement utilisés chez la souris, soit par injection de collagène et d'adrénaline soit par application de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>), ce qui conduit respectivement à une embolie pulmonaire entraînant la mort et à une occlusion des artères carotidiennes (Figure 12) (81). Ces deux modèles sont connus pour être dépendants du facteur XI.

En combinaison avec le FV<sub>Leiden</sub>, le déficit complet en ZPI (ZPI KO) est plus sévère que le déficit complet en PZ (PZ KO). Les souris FV<sub>Leiden</sub>/PZ KO meurent dans les 6 semaines après leur naissance, tandis que les souris FV<sub>Leiden</sub>/ZPI KO meurent aussi bien au cours de la gestation qu'en période périnatale. Dans les deux cas, la mort est due à une coagulation intravasculaire ou à une hémorragie faisant suite à la consommation des facteurs de la coagulation, résultant d'un défaut de régulation de la coagulation (Tableau 2) (81).

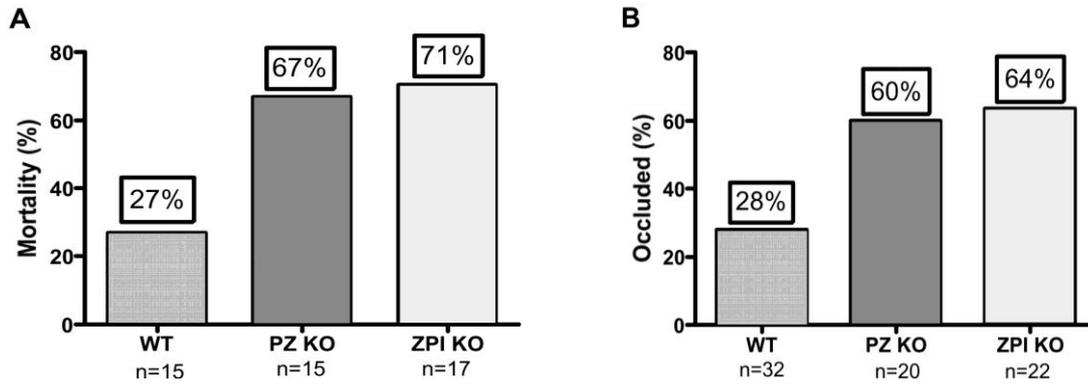


Figure 12 : Effet d'un déficit en PZ ou ZPI sur la mortalité induite par injection de collagène et d'adrénaline (A) ou sur l'application de chlorure ferrique sur la carotide (B).

WT : souris « sauvage » ; KO : souris dont le gène a été délété. L'injection de collagène et d'adrénaline entraîne une embolie pulmonaire et la mort des souris. L'application de chlorure ferrique conduit à une occlusion des artères carotidiennes (81).

Tableau 2 : Comparaison des fréquences génétiques de souris déficitaires en PZ ou ZPI avec des souris FV<sub>Leiden</sub> (FV λ).

	Fréquence observée	Fréquence attendue			Fréquence observée	Fréquence attendue	
<b>FV(λ,λ) / PZ(+/-) x FV(λ,λ) / PZ(+/-)</b>	<b>(à 6 semaines)</b>			<b>FV(λ,λ) / ZPI(+/-) x FV(λ,λ) / ZPI(+/-)</b>	<b>(à la naissance)</b>		
FV(λ,λ)/PZ(+/+)	52%	25%	p < 0,01	FV(λ,λ) / ZPI(+/+)	30%	25%	p = 0,013
FV(λ,λ)/PZ(+/-)	48%	50%		FV(λ,λ) / ZPI(+/-)	50%	50%	
FV(λ,λ)/PZ(-/-)	0%	25%		FV(λ,λ) / ZPI(-/-)	20%	25%	
<b>FV(λ,λ)/PZ(+/-) x FV(+/-) / PZ(-/-)</b>	<b>(à 6 semaines)</b>			<b>FV(λ,λ) / ZPI(+/-) x FV(λ,λ) / ZPI(+/-)</b>	<b>(à 6 semaines)</b>		
FV(λ,λ)/PZ(+/-)	74%	50%	p < 0,01	FV(λ,λ) / ZPI(+/+)	77%	25%	p < 0,001
FV(λ,+)/PZ(-/-)	26%	50%		FV(λ,λ) / ZPI(+/-)	33%	50%	
				FV(λ,λ) / ZPI(-/-)	0%	25%	

La fréquence des génotypes a été étudiée soit à la naissance, soit à 6 semaines.

## II- Le système PZ et ZPI en pathologie

### 1) Valeurs de référence chez le sujet sain

La concentration plasmatique de la PZ a une large distribution et de plus, une différence entre les valeurs moyennes dans différents pays est constatée (Tableau 3). Sachant que la plupart des études utilisaient le même kit commercial pour doser la PZ (dosage immunologique, Asserachrom Diagnostica Stago), excluant ainsi l'hypothèse d'une différence selon la méthode de dosage, cette différence suggère donc une différence selon l'origine ethnique. Ainsi, il a été observé qu'une plus forte concentration plasmatique de PZ est retrouvée chez les afro-américains comparée aux caucasiens ( $p = 0,0005$ ) (83). La concentration plasmatique de PZ ne semble pas présenter de variation avec l'âge (47), sauf dans une étude où une corrélation négative a été reportée (84).

**Tableau 3 : Taux plasmatique de la PZ chez des sujets sains en fonction de l'origine géographique.**

	Pays	Nombre	PZ ( $\mu\text{g/mL}$ )
McQuillan <i>et al.</i> (85)	Australie	186	1,16
Steffano <i>et al.</i> (86)	Uruguay	36	2,71
Vasse <i>et al.</i> (87)	France	88	2,29
Kobelt <i>et al.</i> (88)	Suisse	192	1,5
Cesari <i>et al.</i> (89)	Italie	352	1,74
Lopaciuk <i>et al.</i> (90)	Pologne	100	1,64
Pardos-Gea <i>et al.</i> (91)	Espagne	82	2,44
Oztürk <i>et al.</i> (92)	Turquie	24	1,41
Hinterleitner <i>et al.</i> (93)	Allemagne	68	1,99

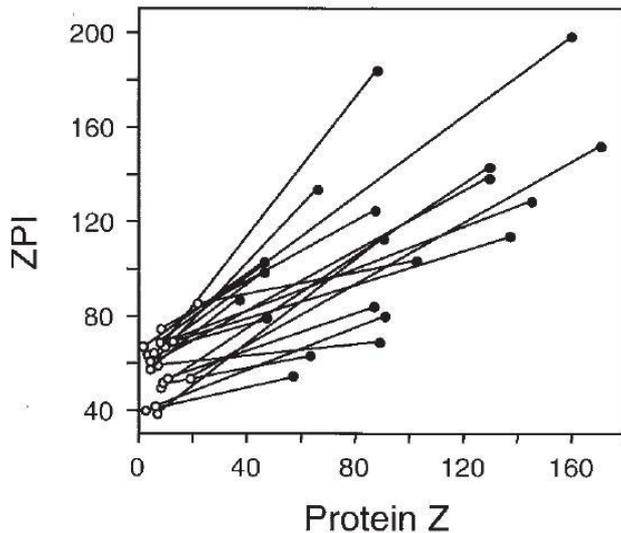
De même, la plupart des études ne mentionnent pas de différence selon le sexe, mais dans quelques études, la concentration plasmatique de la PZ est plus élevée chez l'homme que chez la femme (94) (95), ou inversement (96) (Tableau 4). Le taux plasmatique de PZ est faible chez le nouveau-né (47) (97), surtout chez les prématurés ou ceux dont la mère a eu une pré-éclampsie (98).

**Tableau 4 : Comparaison des taux plasmatiques de PZ chez des hommes et femmes dépourvus de pathologie.**

	Nombre (H/F)	[PZ] ( $\mu\text{g/mL}$ )	[PZ] ( $\mu\text{g/mL}$ )		$p$ H vs F
			Homme	Femme	
Santacroce <i>et al.</i> (94)	100 (41/59)	1,36 $\pm$ 0,61	1,54 $\pm$ 0,70	1,24 $\pm$ 0,52	0,035
Ravi <i>et al.</i> (95)	200 (100/100)	1,42 $\pm$ 0,5	1,50 $\pm$ 0,53	1,35 $\pm$ 0,46	0,03
Fedi <i>et al.</i> (99)	265 (219/46)	1,73 $\pm$ 0,59	1,69 $\pm$ 0,6	1,91 $\pm$ 0,48	0,004

Le taux plasmatique de PZ s'effondre après un traitement par les anticoagulants oraux comme la warfarine (entre 1 et 16 % de la normale). La durée nécessaire pour obtenir cette diminution du taux de PZ a permis d'évaluer sa demi-vie à environ 2 à 3 jours (47).

La concentration plasmatique du ZPI est de l'ordre de 4,5  $\mu\text{g/mL}$ , soit 62,5 nM. Sa concentration plasmatique est fortement corrélée avec celle de la PZ. Lors d'un traitement par la warfarine, le taux de PZ chute et une diminution du taux de ZPI est aussi constatée, alors que cette protéine n'est pas vitamine K-dépendante. Après l'arrêt du traitement, le taux de PZ est restauré et de la même façon, le taux de ZPI augmente proportionnellement à celui de la PZ (figure 13) (100), ce qui suggère que le taux de PZ affecte la concentration plasmatique de ZPI, soit au niveau de sa sécrétion, de sa localisation ou de sa clairance. Cette corrélation est aussi retrouvée chez la souris, en effet chez les souris déficitaires en PZ ou ZPI, une diminution de la protéine partenaire est constatée : chez les souris déficitaires en PZ, le taux de ZPI est de  $76 \pm 12$  % et chez les souris déficitaires en ZPI, le taux de PZ est de  $57 \pm 12$  % de celui d'une souris « sauvage » de même fond génétique (81).



**Figure 13: Variations du taux (en pourcentages) de PZ et ZPI pendant et après traitement à la warfarine.**

*Les points noirs représentent les valeurs mesurées en absence de traitement anti-vitamine K, alors que les points blancs correspondent aux valeurs observées sous traitement par warfarine (100).*

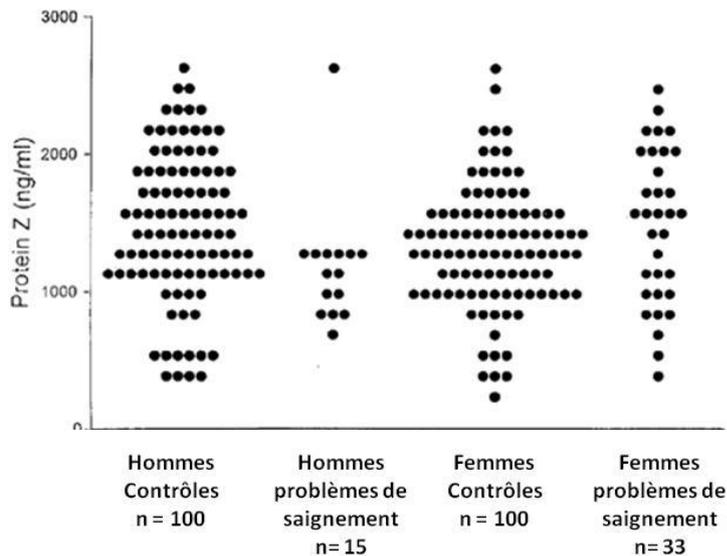
## 2) Variations physiopathologiques

Quelques études ont été menées pour analyser la variation du taux plasmatique de la PZ dans diverses maladies, essentiellement dans les thromboses artérielles et veineuses, et en obstétrique. Par contre très peu d'études ont analysé les taux plasmatiques de ZPI, sans doute en raison de l'absence de trousse commerciale.

### a) Dans les maladies hémorragiques

Initialement, la PZ a été décrite comme favorisant la liaison de la thrombine aux phospholipides, ainsi quelques études ont analysé le taux plasmatique de la PZ chez des patients avec des saignements non expliqués. En 1995, Kemkes-Matthes et Matthes ont rapporté une faible concentration plasmatique de PZ chez 36 patients avec des problèmes hémorragiques (hématomes, saignements post-opératoires, saignements au contact d'objet tranchant, augmentation des saignements menstruels chez les femmes, saignements après l'extraction d'une dent) comparés à une population témoin (1,4 µg/mL vs 2,68 µg/mL,  $p < 0.001$ ). De même, en 1998, un taux plasmatique faible de PZ a été observé chez les hommes avec des problèmes hémorragiques comparé aux témoins ( $p = 0,04$ ), sans que cela ne soit retrouvé chez les femmes (Figure 14) (95). Par contre, une autre étude n'a pas pu montrer une

différence sur le taux de PZ chez 15 patients avec des saignements sans cause apparente comparé aux taux de PZ chez les témoins (101).



**Figure 14 : Concentration plasmatique de la PZ chez des patients avec des problèmes hémorragiques.**

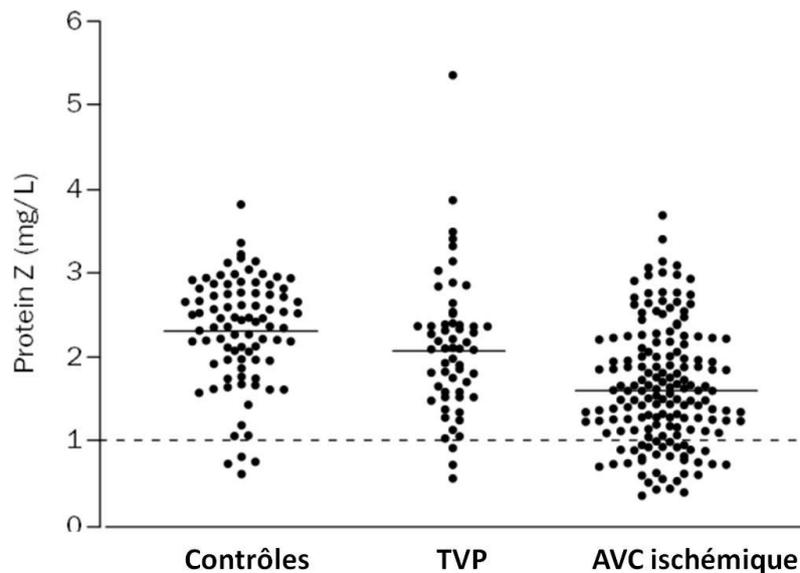
Un score de saignement, qui attribue 0, 1 ou 2 points selon la localisation du saignement (102), a été attribué aux 48 patients analysés : 21 avaient une suspicion de tendance hémorragique (score 1-2), 15 avaient une tendance hémorragique anormale (score 3) et 12 avaient des hémorragies sans équivoque (score >4). Une diminution significative du taux de PZ chez les patients de sexe masculin a été constatée par rapport aux témoins ( $p = 0,04$ ) (95).

En 2018, Hinterleitner et coll. ont associé un déficit en PZ à une augmentation des risques hémorragiques postopératoires. Ils ont observé qu'après une chirurgie de la sphère ORL, 41 % des patients qui ont eu des complications hémorragiques (hémorragie sévère, nécessitant une transfusion sanguine ou une intervention chirurgicale pour contrôler le saignement) avaient un faible taux de PZ ( $< 1,5 \mu\text{g/mL}$ ), contre 23,5 % des patients opérés sans complication hémorragique ( $p = 0,015$ ). Ils en ont conclu qu'un déficit en PZ est un facteur de risque hémorragique (93). Cependant, il s'agit d'une étude rétrospective dont les limites sont connues.

#### b) Dans la pathologie thrombo-embolique

Une première étude menée par Vasse et coll. a montré qu'il y avait une augmentation de la fréquence du déficit en PZ ( $< 1 \text{ mg/L}$ ) chez des patients jeunes (médiane = 36 ans) ayant eu un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, sans autre facteur de risque identifié, alors qu'il n'existait pas une augmentation de la fréquence chez les patients avec une thrombose

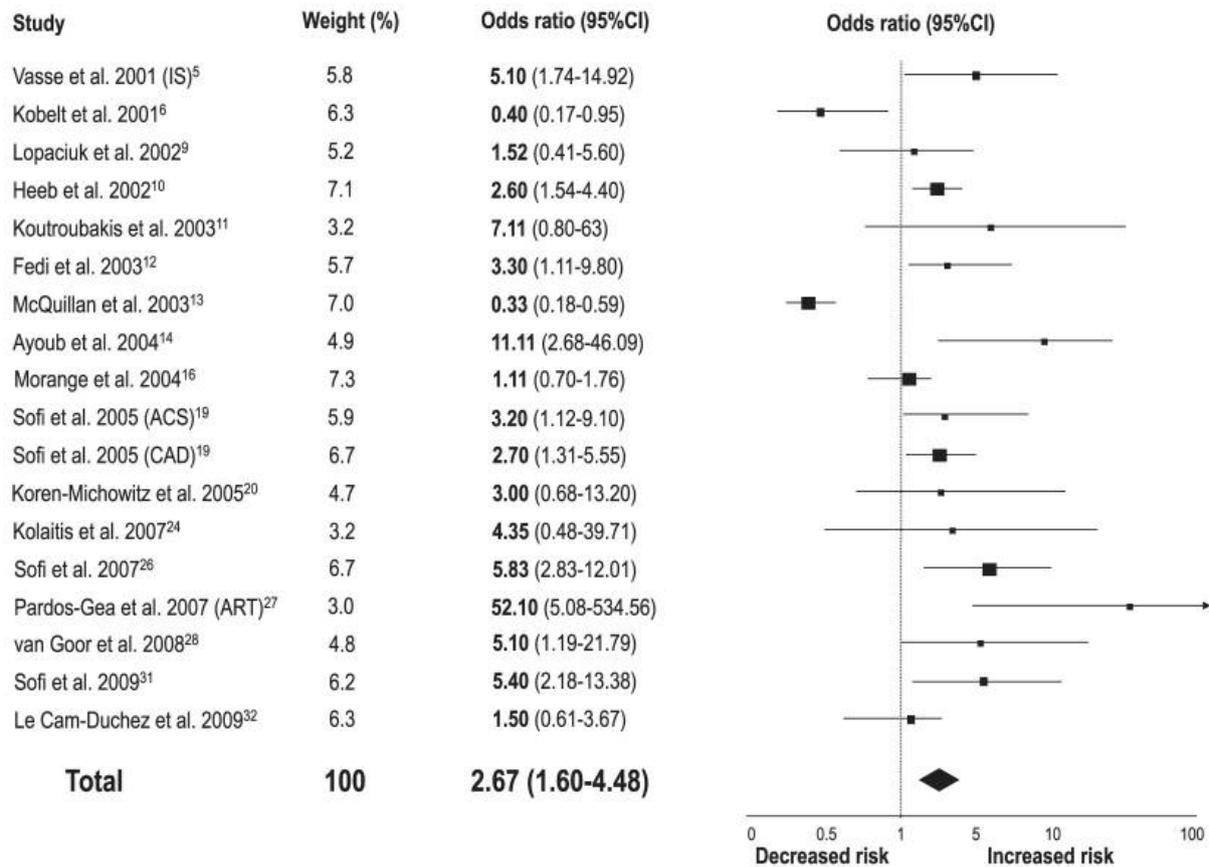
veineuse. Cette étude a été réalisée en France sur 169 patients ayant eu un AVC ischémique et 88 volontaires sains. La concentration moyenne de PZ était plus faible chez les patients ayant développés un AVC. Par ailleurs, 19,5% de ces patients avaient un déficit en PZ, contre 5% des sujets sains (Figure 15) (87). Cependant, des études ultérieures ont montré des résultats contradictoires, notamment celle réalisée par Kobelt et coll. en Suisse, n'observant pas de différence entre la concentration moyenne de PZ chez 125 patients ayant eu un AVC ischémique comparé à 192 témoins. Au contraire, ils ont conclu qu'une augmentation de la concentration de PZ était un facteur de risque pour la survenue d'AVC ischémique (88). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer entre autres par le nombre limité de patients inclus dans les études et le choix des groupes contrôles (personnes saines, âge et sexe), le moment du prélèvement (en phase aiguë de l'épisode ischémique, ou à distance (délai d'au moins 3 mois après l'accident ischémique) et la présence de comorbidités (diabète, lésions athéromateuses).



**Figure 15 : Distribution de la concentration plasmatique de PZ chez les témoins et les patients ayant eu une thrombose veineuse profonde (TVP) ou un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique (87).**

Sofi et coll. ont réalisé une méta-analyse regroupant 2054 patients atteints de pathologies artérielles (contre 3033 contrôles), et 1297 patients avec des thromboses veineuses (contre 1399 contrôles). Il a été montré qu'un déficit en PZ était un facteur de risque pour les maladies thrombotiques artérielles (OR 2,67, IC 95% : 1,6-4,48,  $p = 0,0002$ ), ce qui inclut les

AVC ischémiques, les syndromes coronariens aigus, les maladies coronariennes chroniques et les maladies vasculaires artérielles (Figure 15).



**Figure 16 : Méta-analyse du risque thrombotique artériel associé à une diminution du taux plasmatique de protéine Z (103).**

En 2016, une étude menée aux Etats-Unis sur 239 patients ayant présenté un AVC cryptogénique ischémique (contre 351 contrôles), n'a pas observé de différence significative du taux moyen de PZ entre patients et témoins, mais a observé qu'une concentration plasmatique élevée de PZ (> 2,5 µg/mL) était plus fréquente chez les sujets ayant présenté un AVC ischémique (OR=2,41, IC 95 % : 1,34-4,34,  $p=0,003$ ). Ils ont également analysé les polymorphismes du gène PROZ chez leurs patients et ont observé que les polymorphismes G79A et A13G étaient associés à un taux plasmatique plus faible de PZ et moins représentés chez les patients ayant fait un AVC cryptogénique. Toutefois, leur série de patients a été collectée sur une période longue (octobre 2002 à septembre 2012), et plus de la moitié n'ont pas eu de suivi, ce qui ne permet pas d'exclure des épisodes de fibrillation auriculaire transitoires. De plus, il faut noter que les patients avaient des facteurs de risque clairement identifiés d'AVC, comme une hyperhomocystéinémie, la prise de contraception orale lors de

l'AVC, une dyslipidémie (31,2 % des patients) ou étaient fumeurs (14,1 % des patients). Enfin, il faut noter dans leur population un taux élevé de foramen ovale (58,6 % des patients contre 23,4 % dans la population témoin,  $p < 0,001$ ) (104).

Dans la méta-analyse de Sofi et coll., il a été également conclu qu'un déficit en PZ était aussi un facteur de risque de maladies thrombo-emboliques veineuses (OR 2,18, IC 95% : 1,19-4,00;  $p = 0,01$ ) (103). Inversement, il a été montré, dans la Tromsø Cohort, qu'une augmentation du taux de PZ était un facteur prédictif de la survenue d'un épisode thrombo-embolique veineux (105). Ces résultats sont très surprenants et sont expliqués par les auteurs comme étant possiblement dûs à une compétition entre l'AT et le complexe PZ/ZPI pour inhiber le facteur Xa.

Concernant le ZPI, seulement deux études ont été réalisées pour analyser le taux plasmatique de ZPI chez des patients avec des thromboses veineuses ou artérielles (tableau 5). Il a été observé qu'un taux faible de ZPI pouvait être un facteur de risque de thrombose artérielle, ce qui n'est pas le cas de la thrombose veineuse (100,106). Ces résultats rappellent ceux obtenus avec la PZ, d'ailleurs le dosage de la PZ chez les mêmes patients aboutit à la même conclusion.

**Tableau 5 : Risques associés au dernier tertile, le plus faible, des taux plasmatiques de PZ et ZPI dans les maladies thrombotiques veineuses et artérielles.**

Pathologie	Nombre (T/P)	ZPI		PZ	
		OR (95 % IC)	<i>p</i>	OR (95 % IC)	<i>p</i>
Thromboses veineuses (100)	426/471	0,8 (0,5-1,2)	ns	1,3 (0,9-2,0)	ns
Thromboses artérielles (106)	95/190	2,4 (1,1-5,5)	0,03	5,4 (2,2-13,5)	<0,0001

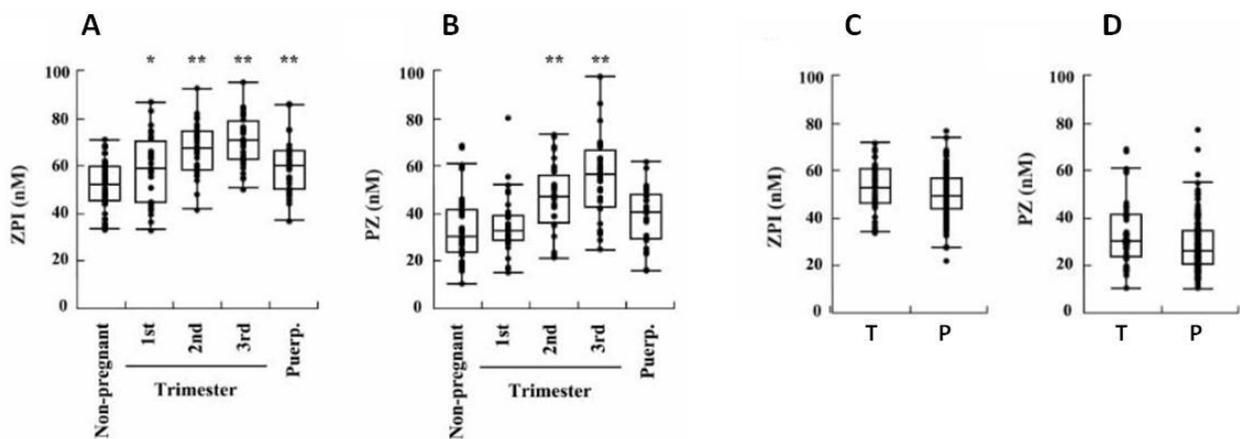
*T/P : nombre des témoins et patients. ns : non significatif*

c) Au cours de la grossesse normale ou pathologique

Au cours de la grossesse, un état d'hypercoagulabilité est présent pour contrôler le saignement, dû à une augmentation des facteurs de la coagulation (fibrinogène, FVII, FVIII, FX, Facteur Willebrand...) et une diminution des protéines anticoagulantes comme la PS.

Le taux plasmatique de la PZ est corrélé au terme de la grossesse, une augmentation significative du taux de PZ est observée à partir du second trimestre de grossesse et continue d'augmenter jusqu'à l'accouchement (107). Il a été proposé que cette augmentation compense

l'augmentation du taux de FX (108). L'absence d'augmentation du taux de PZ constatée au cours de la grossesse chez des patientes avec une hypertension ou un diabète associés à leur grossesse, ou dont l'enfant a un poids anormalement faible à la naissance a été proposé comme marqueur de pathologie obstétricale (109). De même, une augmentation du taux plasmatique de ZPI a aussi été remarqué, rappelant la corrélation des taux plasmatiques des deux protéines (Figure 17) (107).



**Figure 17 : Variations des taux plasmatiques de PZ et ZPI au cours de la grossesse.**

A et B : grossesse normale, C et D : femmes avec des fausses couches répétées, différence non significative pour le taux de ZPI ( $p = 0.30$ ) et significative pour le taux de PZ ( $p = 0.003$ ),  $n = 42$  témoins femmes non enceintes (T) et  $n = 134$  femmes avec des fausses couches répétées (P) (107).

Dans l'étude de Gris et coll, un déficit en PZ est associé à des fausses-couches récurrentes entre 10 et 15 semaines de grossesse, ce qui n'est pas le cas avec les fausses couches plus précoces (à moins de 8 semaines de grossesse) (110). Ceci pourrait être du au fait qu'une diminution du taux de PZ empêche l'invasion du trophoblaste par les artères spiralées, sachant qu'une forte concentration de PZ est observée au niveau des villosités trophoblastiques (111). D'autres complications obstétricales comme une mort fœtale *in utero*, un retard du développement intra-utérin, une pré-éclampsie, un HELLP (*Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet counts*) syndrome, ou une fausse couche sans cause apparente ont été montrées par différentes études (tableau 6). La méta-analyse de Sofi et coll. confirme cette forte association entre un déficit en PZ et les complications obstétricales (OR= 4,17, IC 95% : 2,31-7,52,  $p < 0,00001$ ).

**Tableau 5 : Déficit en PZ et complications obstétricales.**

	Pathologies	Caractéristiques de la population			Protéine Z				
		Ethnie	Nombres (Patient/témoin)	Moyenne d'âge de gestation	Patients	Témoins	p		
Gris <i>et al.</i> , 2002 (110)	mort fœtale précoce	Caucasien	200/200	10-19 sem	NR	2,08	<10 <sup>-4</sup>		
Grandone <i>et al.</i> , 2004 (112)	mort fœtale précoce à répétition		124/60	<14 sem	1,37	1,43	ns		
Bretelle <i>et al.</i> , 2005 (113)	prééclampsie retard de croissance intra-utérine Mort intra-utérine	Caucasien	29/34	31sem	1,75	1,63	0,23 ns		
			25/34	32 sem	1,79		0,041		
			16/34	28 sem	1,57		0,0031		
Paidas <i>et al.</i> , 2005 (114)	prééclampsie, saignement, délivrance prématuré	Hispanique 57 % Caucasien 27 % Asiatique 14 %	106/103	1 <sup>er</sup> trimestre	2,01	2,34	<0,024		
				2 <sup>ème</sup> trimestre	1,47			1,98	<0,0001
				3 <sup>ème</sup> trimestre	1,55				
Erez <i>et al.</i> , 2007 (108)	prééclampsie	Afro-américain (80 %)	130/71	33,9/30	1,6	2,4	<0,01		
Kusanovic <i>et al.</i> , 2007 (115)	accouchement prématuré	NR	54/71	2 <sup>ème</sup> et 3 <sup>ème</sup> trimestres	2.12	2.39	0.008		
Topalidou <i>et al.</i> , 2009 (116)	mort fœtale précoce à répétition (n=2 ou 3)	Caucasien	51/47	8-12 sem	1,28	1,97	<0,001		
Kaygusuz <i>et al.</i> , 2011 (117)	HELLP syndrome	Arabe	29/25	NR	0,86	1,73	<0,001		
Al-Shaikh <i>et al.</i> , 2013 (118)	fausses couches à répétition	Arabe	287/308				<0.002*		

*\*dans cette étude, le taux plasmatique de PZ était diminué et associé au polymorphisme G79A et 2 autres polymorphismes rs302473 et rs3024731, qui ont été montrés comme facteur de risque de fausses couches à répétition. NR : non renseigné, ns : non significatif.*

La présence d'anticorps anti-PZ a également été observée au cours de la grossesse. L'étude de Gris et coll. a observé, chez 171 femmes avec pertes fœtales à répétition ou pré-eclampsies, sans autres anomalies de la coagulation ou d'auto-immunité, un taux élevé d'anti-PZ (IgG et/ou IgM) par rapport au taux d'anti-PZ chez 191 femmes sans complications obstétricales ( $p < 0,001$ ). Il n'y avait pas de corrélation entre le taux de PZ et le taux d'anticorps anti-PZ, sauf dans un sous-groupe de femmes ayant eu des fausses-couches récurrentes, où une corrélation inverse était présente entre le taux plasmatique de PZ et d'IgM anti-PZ (119). Malgré un traitement par enoxaparine, il a été décrit une évolution de grossesse moins favorable chez les patientes ayant un déficit en PZ ou des anticorps anti-PZ que chez les femmes ayant une autre anomalie de la coagulation (mutation II ou V Leiden hétérozygote, déficit en protéine S) (120). Cette association entre un taux élevé d'anticorps anti-PZ et complications obstétricales a été confirmée par d'autres études (121), (122). Aucune étude n'a observé de corrélation entre un déficit en PZ et un taux élevé d'anticorps anti-PZ. Cette absence de corrélation suggère que la présence d'anticorps anti-PZ limite la fonctionnalité de la PZ. Ainsi, un déficit en PZ ou la présence d'une forte concentration d'anticorps circulant anti-PZ semble constituer un facteur de risque de développer une complication obstétricale.

#### d) Syndrome des antiphospholipides (SAPL)

Le SAPL est une maladie auto-immune caractérisée par la survenue de thromboses artérielles et/ou veineuses, souvent associée à des pertes fœtales récurrentes, éventuellement une thrombopénie modérée et la présence d'anticorps antiphospholipides (aPL). Le terme aPL regroupe une large famille d'anticorps reconnaissant les phospholipides anioniques (anticorps anticardiolipine aCL) ou neutres (anticorps antiphosphatidyléthanolamine aPE), ainsi que des protéines associées à ces phospholipides ou ces protéines seules, notamment les anticorps anti- $\beta_2$  glycoprotéine-I ( $\beta_2$ GPI), les anticorps anti-prothrombine, -protéine S, -annexin V, ou -FXIII (123). Ces aPL peuvent être détectés par des techniques immunologiques type ELISA, ou par des tests de coagulation, appelés alors anticoagulant lupique.

Un taux faible de PZ a été décrit chez des patients ayant des aPL (86), (124), (125) tandis que le taux de ZPI n'était pas différent entre patients et témoins (125). Le déficit en PZ est

principalement retrouvé chez les patients avec des anticoagulants lupiques, avec ou sans aCL (86). De plus, il a été montré qu'en présence d'anti- $\beta_2$ GPI et d'aPL, l'inhibition du FXa par le complexe PZ-ZPI est moins efficace. Comme aucune interaction directe entre aPL et PZ n'a été mise en évidence, les auteurs suggèrent que cette interférence résulte de la compétition entre  $\beta_2$ GPI-aPL et PZ-ZPI à se fixer aux phospholipides. Ainsi, la présence simultanée d'aPL et d'un déficit en PZ augmenterait le risque d'avoir une thrombose artérielle d'un facteur 7 (125).

Sailer et coll., chez 102 patients avec des anticorps antilupiques persistants a évalué la fréquence d'anticorps anti-PZ. Une augmentation significative de la fréquence d'anti-PZ de type IgM par rapport à une population témoin sans lupus anticoagulant a été observée (126). Contrairement aux anticorps anti- $\beta_2$ GPI ou aCL, la présence des anticorps anti-PZ n'est pas associée à un risque thrombotique accru. En 2018, une autre étude a évalué le taux d'anticorps anti-PZ chez 86 patients avec aCL, et a montré une fréquence plus élevée d'anticorps anti-PZ, IgG et IgM, chez les patients comparés aux contrôles (n = 59). Comme dans l'étude précédente, il n'y avait pas de différence entre la fréquence de l'anticorps anti-PZ chez les patients avec ou sans épisode thrombotique, par contre sur les 8 femmes avec une perte fœtale, 7 d'entre elles avaient des anti-PZ (127).

En 2016, une étude a observé que le polymorphisme G79A de PROZ, qui est associé à un taux plus faible de PZ, pourrait être « protecteur » envers le SAPL. Seulement 20 % des patients avec un SAPL étaient hétérozygotes pour le génotype (GA) (n = 60), contre 56,1 % des contrôles (n = 41), et une fréquence plus faible de l'allèle A est constatée chez les patients comparés aux contrôles ( $p = 0,001$ ) (128), sans que toutefois un mécanisme ait été proposé.

#### e) Inflammation

*In vitro*, la synthèse de PZ par des hépatocytes en culture ne semble pas être influencée par la présence de cytokines pro-inflammatoires (129), tandis que l'Oncostatine M (une cytokine de la famille de l'IL-6) augmente la sécrétion de PZ seulement sur les capillaires des cellules endothéliales (55).

Une variation du taux plasmatique de PZ a été décrite dans certaines situations inflammatoires, mais les études sont contradictoires. En 1999, une première observation a associé une forte concentration plasmatique en IL-6 ou en fibrinogène à un faible taux plasmatique de PZ chez des patients atteints de lymphome ou de leucémie aigüe (130). La

même observation est faite en 2017, où Gutwein et coll. ont montré une corrélation négative entre le taux d'IL-6 et de PZ chez des patients avec un myélome multiple ( $r = -0,7, p < 0,01$ ) (131). Par contre, Cesari et coll. ont rapporté une augmentation du taux plasmatique de PZ (de 1,54  $\mu\text{g/ml}$  à 1,91  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,04$ ) trois jours après une angioplastie coronaire (132). Les morbidités des patients peuvent expliquer en partie les conclusions contradictoires de ces études, en effet la diminution de la PZ dans les hémopathies peut être la conséquence d'une consommation faisant suite à un état prothrombotique du patient.

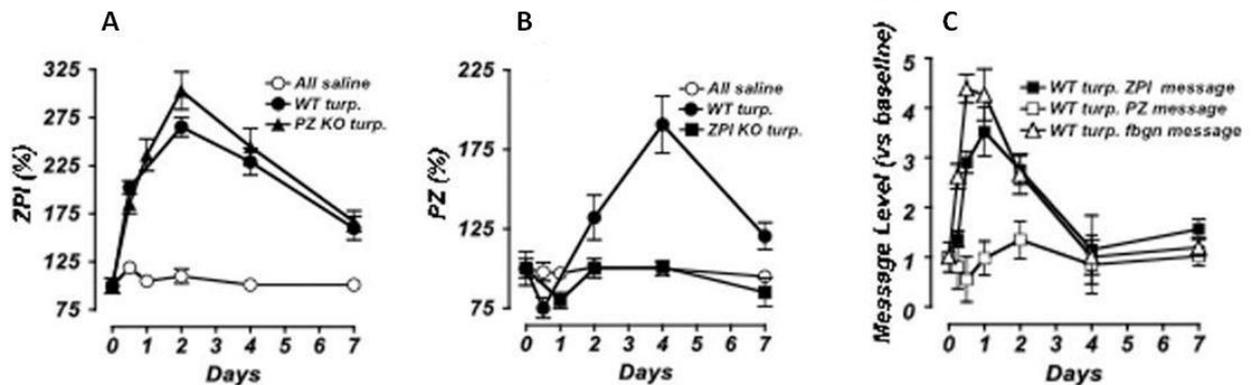
Concernant le ZPI, chez 98 patientes ayant subi une ovariectomie, il a été observé une augmentation des protéines de l'inflammation comme la CRP ou le fibrinogène, mais aussi une augmentation du taux de ZPI, indépendante du statut en oestrogène. L'augmentation de la concentration plasmatique de ZPI après chirurgie n'était pas corrélée à l'augmentation de CRP ou du fibrinogène (1). Inversement Doat et coll. ont observé une corrélation entre CRP et ZPI chez des patients atteints de cancers digestifs (2). Le taux de PZ pré- et post-opératoire n'était pas significativement différent chez ces femmes ovariectomisées.

Il a également été observé une augmentation significative ( $p = 0,023$ ) de ZPI chez 11 patients ayant un rejet aigu après une transplantation rénale (augmentation de 1,23 fois par rapport au taux basal, avant transplantation), corrélé avec l'inflammation due au rejet (133).

De plus, il a également été décrit une augmentation de ZPI (1,45 fois le taux de la population témoin,  $p < 0,05$ ) chez les patients atteints de cirrhose à un stade avancé (134). Comme il existe une régénération cellulaire lors des cirrhoses, cela est à rapprocher de l'augmentation de Rasp-1, homologue chez le rat du ZPI humain, caractérisé par sa capacité à augmenter après hépatectomie (63).

Des études chez la souris ont permis de mieux comprendre la relation entre taux plasmatiques de PZ, ZPI et l'inflammation. Dans un modèle de phase aiguë de l'inflammation, consistant en injection sous-cutanée de turpentine, il a été observé une augmentation à J2 du taux plasmatique de ZPI aux environs de 275 %, alors que l'augmentation du taux plasmatique de PZ est plus tardive (J4) et modérée ( $\approx 175$  %) chez des souris « sauvages » (79). Cependant, il n'y a pas d'augmentation de la PZ lorsque l'injection de turpentine est réalisée sur des souris déficitaires en ZPI (ZPI-KO), alors qu'une augmentation de ZPI est observée chez les souris déficitaires en PZ (PZ-KO) (figures 18 A et B). Le dosage des ARNm montre une augmentation des ARNm du ZPI après injection de la turpentine sans modification des ARNm de la PZ (figure 18 C), ce qui suggère que le ZPI est une protéine de l'inflammation et que

l'augmentation du taux de PZ fait seulement suite à celle du ZPI, en augmentant sa demi-vie. Cette absence d'augmentation des ARNm de PZ en réponse à des cytokines pro-inflammatoires ou à des surnageants de monocytes stimulés par du LPS avait déjà été décrite par Vasse et coll. en 2002 sur la lignée hépatocytaire HepG2 (129).



**Figure 18 : Variations des taux plasmatiques de PZ et ZPI après injection sous-cutanée de turpentine chez des souris « sauvages » ou déficitaires (KO) en PZ ou ZPI.**

A, B) Variations de la concentration plasmatique de ZPI ou de PZ. C) Variations des ARNm de ZPI, de PZ et de fibrinogène dans les hépatocytes de souris traitées par turpentine (79).

#### f) Dans les cancers

Dans une étude incluant 30 patients ayant une hémopathie maligne, aucune différence n'a été relevée entre le taux plasmatique de PZ des malades comparé à celui des contrôles (130). Dans une autre étude sur 80 patients ayant différentes tumeurs malignes, une diminution du taux de PZ a été constatée chez des patients, les plus fortes diminutions étant associées aux stades les plus avancés du cancer. Les auteurs ont conclu qu'un faible taux de PZ était un critère de mauvais pronostic (135).

Dans les cancers digestifs, au diagnostic, il n'a pas été mis en évidence d'augmentation du ZPI ni de PZ, mais une absence de corrélation entre les taux plasmatiques de ZPI et de PZ qui pourrait être expliquée par une production ectopique de ces protéines par les cellules cancéreuses, d'autant plus que la corrélation est retrouvée chez les patients en rémission. En revanche, le taux de ZPI était corrélé au taux de CRP, suggérant un lien entre valeur plasmatique de ZPI et inflammation (2).

Dans le cancer du pancréas, une surexpression de l'ARNm du ZPI au niveau des cellules tumorales a été décrite, et elle est plus marquée pour les stades métastatiques (136). La présence de l'ARNm du ZPI a aussi été détectée chez les cellules entérochromaffines et neuroendocriniennes dans les cas de cancer gastro-intestinal (137). De plus, des études immunohistochimiques ont permis d'affirmer la présence du ZPI et de la PZ dans les cellules de cancer du sein, alors que le tissu mammaire sain n'en contient pas (138,139).

La PZ et le ZPI sont exprimés à la surface des cellules cancéreuses, des cellules endothéliales et des *Tumor-associated macrophages* (TAMs) dans le cancer des poumons non à petites cellules (140). Dans le cancer du côlon, les ARNm du ZPI et de la PZ sont retrouvés dans les cellules cancéreuses, ainsi qu'une colocalisation entre PZ/ZPI et le FX à la surface des cellules cancéreuses et des TAMs (141). De même, dans le cancer gastrique, une colocalisation de PZ/ZPI et du FX a été mise en évidence à la surface des cellules cancéreuses, des cellules endothéliales et des TAMs ainsi que les ARNm de PZ et ZPI dans les cellules cancéreuses (142).

g) Polymorphismes/mutations et phénotypes associés

Les polymorphismes identifiés de la PZ sont corrélés à une diminution de son taux plasmatique (Tableau 6). De ce fait, les analyses des polymorphismes chez les patients vont dans le même sens que les effets d'un déficit en PZ. A ce titre, la mutation G79A a été décrite comme associée à des complications obstétricales chez les femmes enceintes (143), (118). Le polymorphisme G42A a aussi été montré comme associé à des pertes fœtales (144).

**Tableau 6 : Impact des polymorphismes de la PZ sur sa concentration plasmatique (145).**

Polymorphismes	[PZ] plasmatique (µg/mL) moyenne ± SD	p
<b>PZ A13G</b>		
AA	2,16 ± 0,59	< 0,02
AG	1,78 ± 0,58	
GG (n= 0)		
<b>PZ G103A</b>		
GG	2,27 ± 0,54	< 0,001
GA	1,77 ± 0,53	
AA	0,74	
<b>PZG79A</b>		
GG	2,33 ± 0,48	< 0,001
GA	1,79 ± 0,60	
AA	1,15 ± 0,35	

Deux polymorphismes du ZPI, R67X et W303X, ont été particulièrement étudiés depuis leur identification, ils induisent un codon stop au cours de la traduction de la protéine. Les auteurs ont supposés qu'une expression de seulement 50 % du ZPI serait présente chez les personnes hétérozygotes pour ces 2 polymorphismes, sans qu'aucune étude n'a pour le moment évalué le taux de ZPI plasmatique chez ces patients (58).

Les premiers résultats, obtenus chez 250 patients avec des antécédants thrombo-emboliques, en comparaison à 250 témoins, ont montré une association entre les polymorphismes R67X et W303X du ZPI et le développement de thrombose veineuse profonde (TVP) (58). Par contre, Fabbro et coll. n'ont pas trouvé de lien entre ces deux polymorphismes et l'apparition de TVP dans une cohorte de 183 patients (146). Finalement, une méta-analyse comprenant 5 études, et regroupant près de 5000 patients a conclu à l'absence d'association entre les polymorphismes R67X et W303X du ZPI et TVP (OR 1,63; 95% IC 0,84-3,16 et OR 1,21; 95% IC 0,29-4,98 respectivement) (60).

Ces deux polymorphismes du ZPI ont aussi été étudiés dans d'autres pathologies. Une fréquence plus élevée de R67X et W303X a notamment été remarqué chez des femmes ayant eu des fausses couches à répétition. Comme les fausses couches induites par ces polymorphismes étaient observées plus tard dans le développement de l'embryon, il a été suggéré que le système PZ/ZPI entraîne des problèmes de perméabilité vasculaire (147).

**Tableau 7 : Polymorphismes nucléotidiques (*single-nucleotide polymorphism, SNP*) du gène codant pour le ZPI chez les patients avec des fausses couches à répétition.**

<i>SNP</i>	Position du gène	Allèle	Contrôles*	Patients*	<i>p value</i>	OR (95 % IC)
R67X	728 C>T	C : T	14 (0,02)	34 (0,06)	0,003	2.66 (1.40–4.87)
W303X	1438 G>A	G : A	12 (0,02)	27 (0,05)	0,014	2.44 (1.21–4.71)

*\*304 sujets sains et 288 femmes avec des fausses couches à répétition ont été analysés, la fréquence des polymorphismes est entre parenthèse (147).*

Il a également été recherché une association entre les polymorphismes R67X et W303X du ZPI et des thromboses de prothèse valvulaire : aucune association n'a pas pu être mise en évidence. Mais ces polymorphismes sont rares, seule une personne sur les 20 sujets étudiés présentait R67X (148), par conséquent un nombre plus conséquent de patients serait nécessaire pour pouvoir conclure. En 2016, un polymorphisme nucleotidique a aussi été

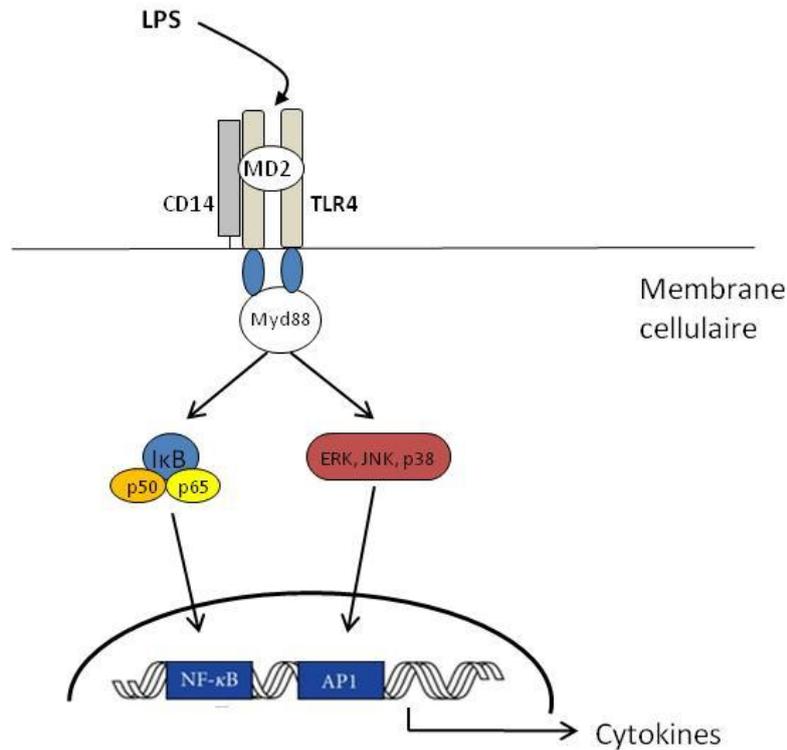
identifié avec le séquençage nouvelle génération (NGS), le rs2232710, puis étudié chez des patients avec une TVP, qui s'est conclue par l'absence d'association (149).

### III- Interactions entre coagulation et inflammation

La coagulation et l'inflammation sont deux systèmes de défense complémentaires dans l'élimination des pathogènes, la limitation de leur infiltration tissulaire, et la restauration de l'homéostasie. Il existe une forte interaction entre ces deux systèmes : en effet l'inflammation conduit à l'activation de la coagulation, et les facteurs de la coagulation sont responsables de la production de médiateurs de l'inflammation.

#### 1) Le système immunitaire inné

Les cellules immunitaires et les cellules endothéliales ont des récepteurs nommés « *Pattern Recognition Receptors* » (PRRs), qui reconnaissent le motif « *Pathogen-Associated Molecular Patterns* » (PAMPs) à la surface des pathogènes, motif non présent chez les vertébrés. Cette identification va entraîner la transduction du signal et ainsi la sécrétion de cytokines, de chimiokines et autres médiateurs de l'inflammation (150). Les PRRs peuvent aussi reconnaître les médiateurs d'une inflammation dite stérile, en absence de pathogène, induite par un traumatisme mécanique, une ischémie ou un stress environnemental, ce sont les « *Danger-Associated Molecular Patterns* » (DAMPs), qui peuvent également stimuler la réponse immunitaire (151). Le plus connu des PAMPs est le lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram négatives, et son PRR est le « *Toll-like Receptor* » de type 4 (TLR4). La reconnaissance d'un composant microbien par le TLR entraîne une cascade de réponses cellulaires, conduisant à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et à la production de cytokines inflammatoires (152).



**Figure 19 : Fixation du LPS à son récepteur TLR4 et induction de la sécrétion de cytokines.**

*Le LPS en se fixant sur son récepteur TLR4, en présence de ses cofacteurs MD2 et CD14, va activer la voie du Myd88. Cette voie va entraîner la phosphorylation d'IκB et des MAPK (ERK, JNK et p38), ce qui conduit à la translocation des facteurs de transcription NFκB et AP-1 dans le noyau et finalement la sécrétion de cytokines.*

## 2) L'immunothrombose

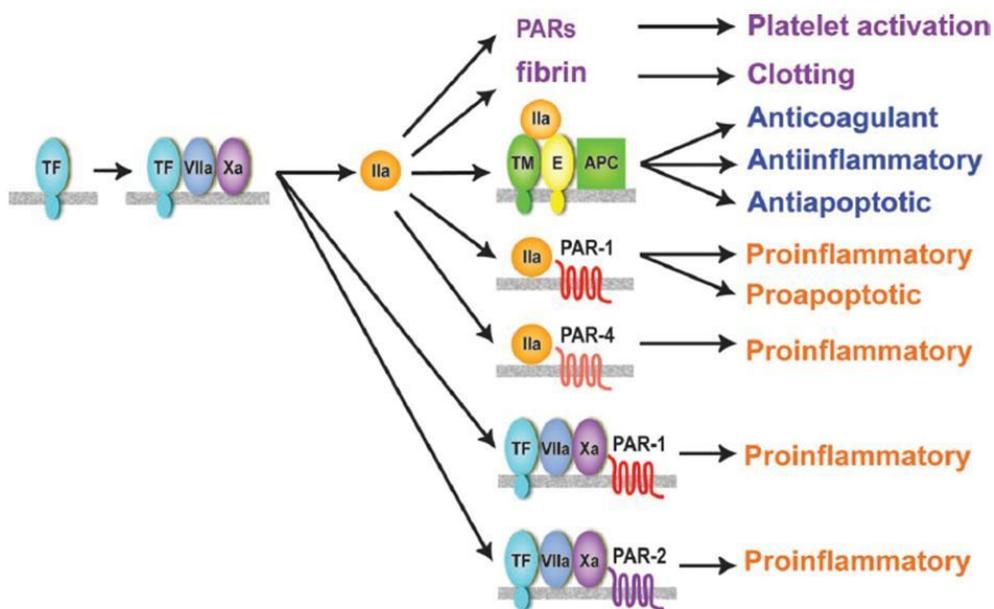
La thrombose est une déviation pathologique de l'hémostase, caractérisée par la formation d'un thrombus intravasculaire sans « lésion » conduisant à l'occlusion du vaisseau. Cependant, il a aussi été suggéré que la thrombose serait un processus physiologique, servant d'effecteur intrinsèque à l'immunité innée, ce rôle physiologique est appelé immunothrombose (4). Des mécanismes moléculaires spécifiques constituent l'immunothrombose, suggérant que c'est un processus de défense indépendant et un élément crucial dans l'immunité intravasculaire permettant la détection et la protection contre les pathogènes.

### a) L'expression du FT

L'activation des cellules immunitaires (principalement les monocytes) lors d'une infection, conduit à l'expression de FT à leur surface, FT qui retrouvé également sur les microparticules

libérées par activation cellulaire (153,154). Le FT est le principal activateur de la coagulation, et peut aussi être exprimé par d'autres types cellulaires, tels que les neutrophiles, les éosinophiles, ou encore les plaquettes (155–157). L'activation de la coagulation entraîne la formation de *microthrombi* dans les petits vaisseaux, qui agit comme une matrice et empêche la propagation de l'agent pathogène et l'invasion tissulaire (158). Les cellules immunitaires vont s'accumuler localement et les cellules endothéliales de la microcirculation adoptent alors un phénotype pro-adhésif (159).

Les protéases de la coagulation, notamment le FVIIa, le FXa et la thrombine possèdent une activité pro-inflammatoire en se liant à leurs récepteurs « *Protease Activated Receptors* » (PAR) présents à la surface des plaquettes, des cellules endothéliales et des leucocytes (Figure 20) (160). La plus connue est l'interaction de la thrombine avec PAR-1 entraînant son clivage et conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-8, ainsi qu'à l'expression des molécules d'adhésion (P-sélectine, E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1). La thrombine va ainsi activer et fragiliser la barrière endothéliale favorisant sa perméabilité (161) et activer les plaquettes.

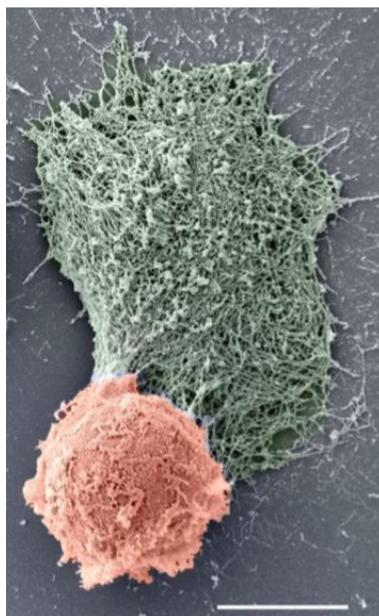


**Figure 20 : Rôle des récepteurs aux protéases activées (PARs) dans l'interrelation entre l'inflammation et la coagulation.**

*L'expression du facteur tissulaire (TF) active la coagulation et conduit à la formation de la thrombine (IIa). La thrombine active les plaquettes, clive le fibrinogène, et en se fixant à la thrombomoduline (TM) va activer la protéine C, elle-même fixée à son récepteur (E), pour générer de l'APC. La thrombine active aussi les PAR-1 et PAR-4, tandis que le complexe TF-VIIa-Xa active PAR-1 et PAR-2 (162).*

b) Les Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Les neutrophiles peuvent phagocyter les agents pathogènes et sécréter des granules pour les éliminer, ou encore libérer leur contenu nucléaire formé essentiellement des histones et des fragments d'ADN. Ce dernier mécanisme, qui est une forme de mort cellulaire différent de la nécrose et de l'apoptose, permet la libération des NETs, est appelé NETose. Les NETs sont constitués de fibre de chromatines et d'histones, recouverts d'enzymes comme l'élastase neutrophile, la myelopéroxydase, la cathepsine G et de peptides antimicrobiens comme la défensine et cathelicidine. Lors de sa mise en évidence, la NETose a été induite par le traitement des neutrophiles par le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (163). Par la suite, d'autres inducteurs ont été décrits, incluant les bactéries et leurs composants, les champignons, les virus, les protozoaires, les plaquettes activées, les autoanticorps, l'IL-8 ou encore les fumées de cigarette (164).

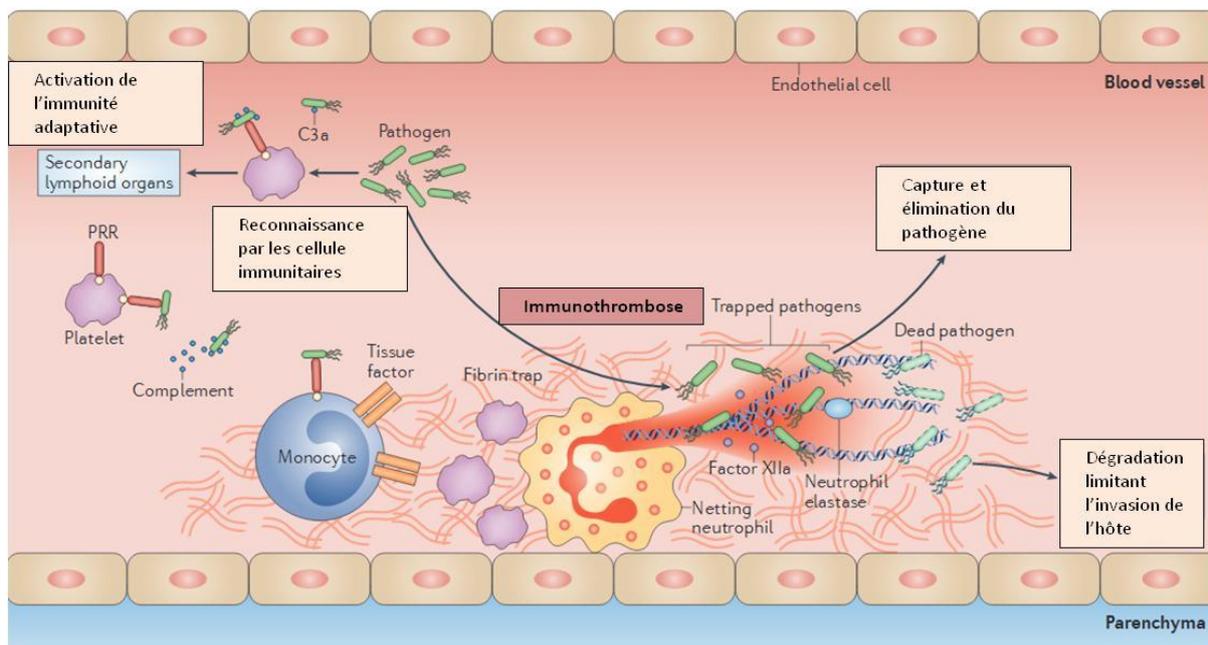


**Figure 21 : Image en microscopie électronique d'un polynucléaire neutrophile formant des NETs.**

*Le polynucléaire est représenté en rose, les NETs, colorés en vert, forment une toile s'échappant de la membrane plasmatique (165).*

Les NETs jouent un rôle crucial dans la défense de l'organisme, d'une part, par une activité antimicrobienne directe, en se liant aux bactéries à Gram positif et négatif, et en les éliminant grâce aux enzymes et peptides antimicrobiens à leur surface ; et d'autre part, par un mécanisme procoagulant :

- L'ADN chargé négativement peut activer le FXII et ainsi la voie du système contact. Dans un modèle de thrombose artérielle chez la souris (application de  $FeCl_3$  sur l'artère carotidienne), les souris déplétées en neutrophiles par injection d'anticorps anti-Ly6G ne présentent pas de NETs et développent moins de *thrombi* par rapport aux souris contrôles. Le même constat est retrouvé chez les souris ayant reçu de la DNase1, responsable d'un clivage du réseau de NETs (166).
- Les NETs peuvent entraîner le recrutement des plaquettes par fixation du facteur von Willebrand, et les activer grâce aux histones H3 et H4 (167).
- Les enzymes décorant les NETs clivent et oxydent les protéines anticoagulantes, notamment le TFPI et la thrombomoduline (158).



**Figure 22 : Rétention des pathogènes par l'immunothrombose.**

L'immunothrombose et ses principaux acteurs constitueraient un système de défense de l'organisme, incluant la reconnaissance du pathogène, sa capture et dégradation, la prévention d'une invasion de l'hôte, ainsi que l'activation de l'immunité adaptative (figure adaptée de Engelmann et coll., *Nature Reviews*, 2013) (4).

### c) Les plaquettes

La reconnaissance des plaquettes comme étant en même temps un acteur important de la coagulation et de l'inflammation reflète bien l'interrelation entre les deux mécanismes et le concept d'immuno-thrombose. Comme indiqué précédemment, les plaquettes sont recrutées et activées par les NETs. Inversement, les plaquettes peuvent amplifier la production des NETs en se liant directement aux neutrophiles et en libérant notamment la  $\beta$ -défensine, connue comme inducteur de la NETose (168,169). Les plaquettes activées vont libérer des médiateurs :

- impliqués dans le recrutement leucocytaire, comme le *Platelet Factor 4* (PF4), le *Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ) ou le *Regulated upon Activation, normal T cell Expressed and Secreted* (RANTES, CCL5) (170)
- capables d'amplifier l'activité antimicrobienne des leucocytes comme le CD40 ligand ou le *Trigerring Receptor expressed on myeloid cells 1* (TREM1) (171)
- les DAMPS comme le *protein disulphide isomerase* (PDI) qui peut activer le FT (172).

Les plaquettes et les mastocytes sont aussi connus pour libérer des polyP solubles, capables d'activer le FXII s'ils sont présents en grande quantité (173).

## 3) **Système contact et inflammation**

### a) Activation du système contact par les pathogènes

L'activation du système contact est la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes. Nombreuses sont les études qui indiquent que le système contact est important contre les infections bactériennes, parasitaires ou virales (174–176)

Les bactéries, à Gram positif ou négatif, peuvent activer directement le système contact en permettant l'assemblage des facteurs du système contact à leur surface (177). La liaison du KHPM à la surface bactérienne est spécifique et de forte affinité, avec une constante de dissociation de l'ordre du nanomolaire, la liaison se fait *via* les domaines D3 et D5 du KHPM, comme pour sa liaison aux cellules endothéliales (178,179). Selon la souche bactérienne, elle peut directement cliver le KHPM, ou activer le FXII et la PK, pour induire la génération de BK.

D'autres pathogènes comme les champignons, les virus et les parasites peuvent aussi interagir avec les protéines du système contact (177).

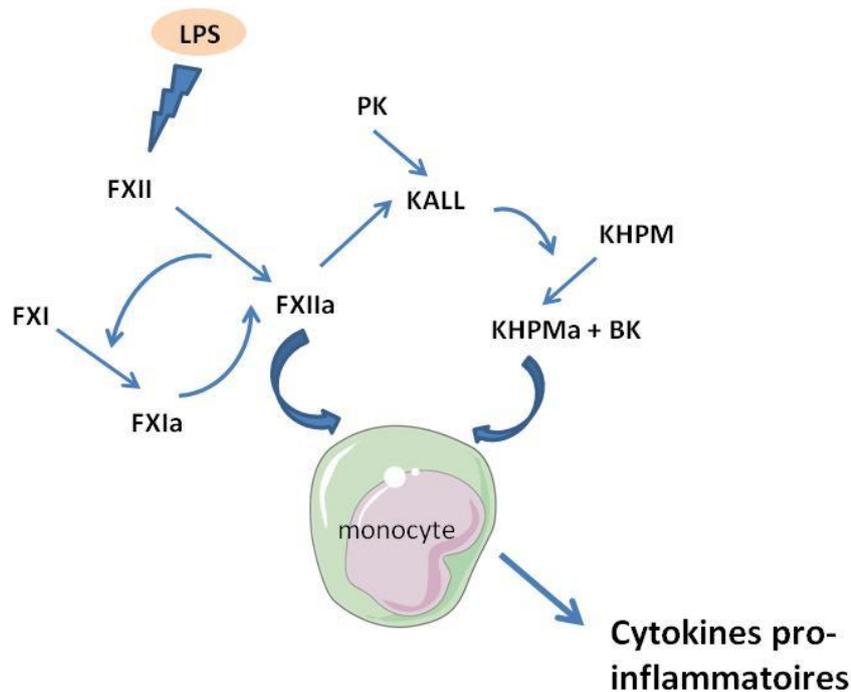
La présence de pathogènes peut aussi entraîner la libération des activateurs du système contact, notamment les NETs et les polyP provenant des plaquettes activées ou des bactéries elles-mêmes (180). Certaines bactéries, comme les *Staphylococcus aureus* et *Porphyromonas gingivalis* secrètent des protéases capables de cliver le KHPM, le FXII ou la PK (181). Pour le LPS, les études *in vitro* montrent une activation du FXII, de la PK et du KHPM, que ce soit dans des milieux purifiés ou dans le plasma, par des fortes doses (de l'ordre du µg/mL) de LPS d'*E.coli* (182,183). Par contre, après injection intraveineuse d'une faible dose de LPS (4 ng/kg) chez des volontaires sains, l'activation du FXII ou de la PK n'a pu être mise en évidence (184,185).

#### b) Activités pro-inflammatoires des produits de la voie du système contact

Le plus connu comme acteur majeur dans l'inflammation suite à l'activation du système contact est la BK. Elle peut se lier aux récepteurs B1 et B2 (B1R et B2R), dont l'expression est constitutive pour B2R, et faible pour B1R dans des conditions physiologiques mais potentialisée par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β (186). La signalisation *via* B2R est responsable de l'inflammation, incluant vasodilatation et douleur (187).

L'activation du système contact conduit aussi à l'activation du système du complément, qui fait partie de la réponse immunitaire innée. Le βFXIIa est un faible activateur du FXI mais peut initier la voie classique du complément en activant le facteur C1. La KALL est décrite comme pouvant activer le facteur C3 du complément (188,189).

Les produits du système contact comme le FXIIa et le KHPM clivé stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes (Figure 23) (190,191). Ils sont capables d'induire un recrutement leucocytaire au site d'infection (192,193). Ces fragments de KHPM, notamment les domaines D3 et D5 ont aussi été décrits comme ayant de propriétés antimicrobiennes (194,195).



**Figure 23 : Activités pro-inflammatoires des produits d'activation de la voie du système contact.**

Le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif peut activer la voie du système contact en activant le FXII en FXIIa (183,196,197), puis le FXIIa active le FXI en FXIa, qui à son tour amplifie la production de FXIIa (11). Le FXIIa a aussi comme substrat la prékallikréine (PK), qui va s'activer en kallikréine (KALL) et conduire au clivage du kininogène de haut poids moléculaire en KHPMa. Le FXIIa et le KHPMa peuvent stimuler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes (190,191).

### c) Mécanismes échappatoires des bactéries

L'évolution a fait que certains pathogènes arrivent à contourner les mécanismes de défense de l'organisme, dont l'immuno-thrombose. Par exemple, les streptocoques peuvent exprimer le streptokinase, qui peut activer le plasminogène en plasmine et dissoudre le réseau de fibrine (198), leur permettant d'infiltrer les tissus, probablement en prévenant l'immuno-thrombose (199). Il a aussi été montré que les *Streptococcus pyogenes* et *S. pneumoniae* pouvaient exprimer de la DNase et dégrader les NETs, responsable d'infections invasives, comme les fasciites nécrosantes et les pneumonies (200,201). Avec la staphylocoagulase et la *von Willebrand factor-binding protein*, le *Staphylococcus aureus* peut stimuler la génération de fibrine en activant la prothrombine, créant ainsi une barrière pour empêcher les cellules immunes de les atteindre (202,203).

## IV- Le sepsis

Le sepsis est une des situations cliniques dans laquelle on retrouve le rôle majeur des interactions entre inflammation et coagulation. Le sepsis correspond à une réponse inflammatoire généralisée associée à une infection grave, et au cours de laquelle le patient se retrouve dans un équilibre instable entre une tendance pro-thrombotique et hémorragique. La signalisation passant par NFκB est finement régulée pour éviter des réponses inflammatoires excessives, mais lors d'une infection systémique et sévère, comme le sepsis, les TLRs sont surexprimés et contribuent à l'exagération des réponses pro-inflammatoires (152). Par ailleurs, les microorganismes pathogènes vont entraîner l'expression de FT par les monocytes/macrophages, accompagnée d'un dérèglement des mécanismes anticoagulants (AT, système de la PC, TFPI) et une suppression de la fibrinolyse (204). L'immunothrombose va ainsi se mettre en place, la libération des NETs et l'abondance des débris cellulaires dans la circulation sanguine pouvant conduire à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (205). Dans le sepsis, l'immunothrombose devient délétère, elle aboutit à la formation de caillots dans les microvaisseaux et à une activation excessive de l'inflammation, aggravée par la capacité de ces deux systèmes à se potentialiser mutuellement. La prise en charge du patient nécessite la prise en compte de sa coagulopathie au cours de l'infection. Trois phases vont ainsi se succéder: d'abord une hémostase adaptative, puis une CIVD thrombotique (défaillance multiviscérale), et enfin une phase de CIVD fibrinolytique (206).

### 1) Epidémiologie et définitions

Les hospitalisations pour sepsis ont presque doublé ces dix dernières années, avec un coût estimé à plus de 20 milliards de dollars en 2011 aux Etats-Unis, ce qui représente une préoccupation de santé publique majeure (207). De plus, le choc septique représenterait plus de 60 % des états de choc rencontrés en réanimation (208). Cependant des controverses persistent quant à la définition exacte du sepsis et du choc septique, rendant difficile de préciser l'incidence et la mortalité, ce qui a conduit à l'établissement de nouvelles définitions lors d'une conférence de consensus en 2016.

Auparavant, le sepsis se définissait comme une réponse inflammatoire systémique à l'infection (*Systemic Inflammatory Response Syndrome* ou SIRS), avec les notions de sepsis sévère (sepsis associé à une défaillance d'organe, une hypoperfusion ou une hypotension) et

de choc septique (sepsis associé à une hypotension malgré une expansion volémique adéquate) (209). La notion de SIRS, définie par la présence d'au moins deux des caractères suivants : température  $> 38^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$ , fréquence respiratoire  $> 20/\text{mn}$ , fréquence cardiaque  $> 90$  battements par minutes (bpm) et numération leucocytaire  $> 12 \text{ G/L}$  ou  $< 4 \text{ G/L}$  procurait au terme sepsis une grande sensibilité et une faible spécificité. La présence d'un SIRS est ainsi rapporté chez près de 90 % des patients à l'admission en réanimation (210).

En conséquence, le sepsis est maintenant défini comme une dysfonction d'organe secondaire à une dérégulation de la réponse de l'hôte à l'infection, menaçant le pronostic vital (207). Des critères cliniques ont ensuite été proposés à partir des scores SOFA (Figure 24), et un autre score, le qSOFA permet d'alerter le clinicien à chercher une défaillance d'organes surtout pour les patients hospitalisés hors réanimation, incluant les critères suivants : fréquence respiratoire  $\geq 22/\text{mn}$ , altération du statut mental et pression artérielle systolique  $\leq 100 \text{ mmHg}$ . Ensuite, le choc septique est défini comme un sous-groupe de sepsis caractérisé par des anomalies circulatoires, métaboliques et cellulaires intenses associées à une mortalité plus importante que dans le sepsis (207). Les critères cliniques retenus correspondent à un sepsis associé à une hypotension persistante requérant des vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle moyenne (PAM)  $\geq 65 \text{ mmHg}$  et une lactatémie  $\geq 2 \text{ mmol/L}$ .

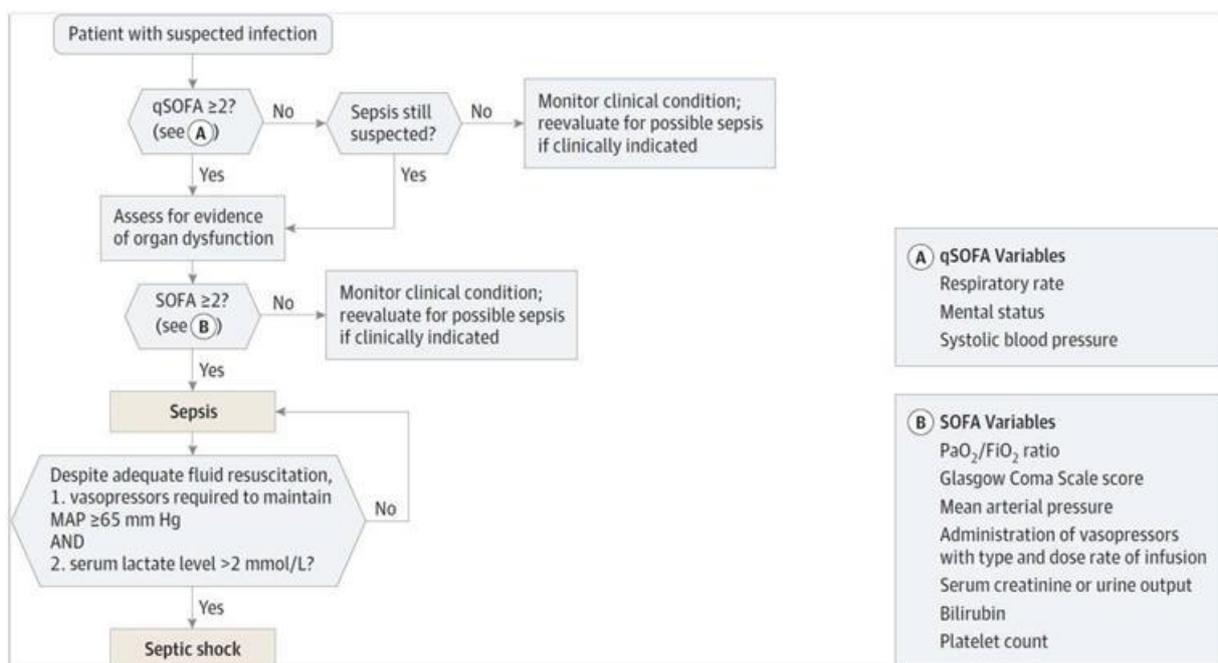


Figure 24 : Critères permettant d'identifier le sepsis ou le choc septique chez les patients (207).

L'activation de la coagulation au cours du sepsis conduit au phénomène d'immuno-thrombose. Une des complications du choc septique est l'apparition de CIVD, pouvant conduire aux défaillances multiviscérales et la mort. En l'absence de marqueur unique pour la CIVD, son diagnostic repose sur l'association de plusieurs tests d'hémostase, obtenu grâce à un effort international de standardisation. Actuellement, deux scores sont utilisés pour le diagnostic de la CIVD : le score proposé par l'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) et un autre score proposé par le *Japanese Association for Acute Medicine* (JAAM).

## **2) Les scores de l'ISTH et du JAAM pour l'identification d'une CIVD**

Le score de l'ISTH a été proposé en 2001 et souligne notamment la nécessité d'établir la présence d'une pathologie sous-jacente connue pour être responsable d'une CIVD avant de calculer le score. C'est un modèle simple pour une utilisation pratique au quotidien, un total de points  $\geq 5$  étant compatible avec le diagnostic de CIVD « décompensée », et un score  $< 5$  à une possible CIVD « compensée » (tableau 8).

Le score du JAAM a été proposé en 2005 et selon différentes études (211,212), s'avère plus sensible que le score de l'ISTH. Cette plus grande sensibilité est probablement due à la prise en compte de la cinétique des plaquettes, alors que le score de l'ISTH prend en compte le taux de plaquettes au moment du calcul du score (tableau 9).

Au total, les deux scores ne présentent pas de différence fondamentale, une plus grande sensibilité est notée avec le score du JAAM mais une plus grande simplicité d'utilisation pour le score de l'ISTH. De plus, le manque de sensibilité de ce dernier est corrigé lorsque le test est répété quotidiennement.

**Tableau 8 : Score diagnostique de la CIVD selon la *Japanese Association for Acute Medicine* (JAAM) (213).**

	Points
<b>Critères de réponse inflammatoire systémique</b>	
≥ 3	1
0-2	0
<b>Numération plaquettaire (G/L)</b>	
< 80 ou diminution > 50 % en 24 heures	3
≥ 80 et < 120 ou diminution > 30 % en 24 heures	1
≥ 120	0
<b>Fibrinogène (g/L)</b>	
< 3,5	1
≥ 3,5	0
<b>Temps de Quick (ratio patient/témoin)</b>	
≥ 1,2	1
< 1,2	0
<b>Produits de dégradation de la fibrine (mg/L)</b>	
≥ 25	3
≥ 10 et < 25	1
< 10	0
CIVD si le score est ≥ 5	

**Tableau 9 : Algorithme diagnostique pour la CIVD « décompensée » selon l'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) (211).**

Evaluation du risque: le patient est-il atteint d'une pathologie connue pour être associée à la présence d'une CIVD
Si OUI: réaliser le test
Si NON: ne pas utiliser cet algorithme
Réaliser les tests d'évaluation globale de la coagulation
numération plaquettaire, temps de prothrombine, fibrinogène, marqueurs de la dégradation de la fibrine: produits de dégradation de la fibrine ; D-dimères ; monomères de fibrine soluble
Evaluer les résultats des tests
Plaquettes (> 100 = 0 ; < 100 = 1 ; < 50 = 2)
Marqueurs de la dégradation de la fibrine (pas d'augmentation : 0 ; augmentation modérée : 2 ; augmentation forte : 3)
Allongement du temps de Quick (< 3 secondes = 0 ; > 3 secondes mais < 6 secondes = 1 ; > 6 secondes = 2)
Taux de fibrinogène (> 1 g/L = 0 ; < 1 g/L = 1)
Calculer le score
Si score ≥ 5 : compatible avec une CIVD "décompensée" ; répéter quotidiennement le score
Si score < 5 : évoque sans affirmer une CIVD "compensée" ; répéter à 24-48 heures.

### 3) La sécrétion de cytokines pendant le sepsis

Le terme cytokine désigne une classe de petites protéines (généralement < 40 kDa) qui sont des médiateurs de l'activation ou de la différenciation des cellules immunitaires. Au cours du sepsis, il y a une forte production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-12, l'interféron- $\gamma$  et le MIF, mais aussi de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et l'IL-4. Il y a une interaction dynamique dans le processus de production de ces cytokines et le sepsis ne peut se résumer à une simple succession d'une phase pro-inflammatoire et anti-inflammatoire (214). Dans un modèle *in vitro*, par stimulation des cellules mononucléées par le LPS, la sécrétion de cytokines est détectable dans les premières heures, les cytokines n'ayant ni la même cinétique, ni le même délai pour atteindre leur pic de sécrétion (Figure 25).

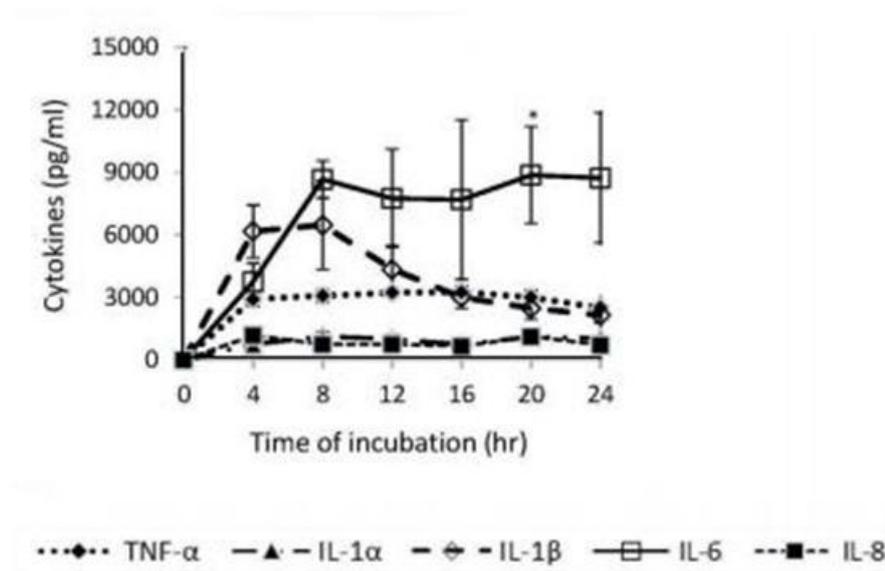


Figure 25: Cinétique de sécrétion du TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-8 par les cellules mononucléées sanguines après stimulation par le LPS (100 ng/mL) (215).

Le TNF- $\alpha$  est une des cytokines les plus étudiées dans la physiopathologie du sepsis et ceci pour trois raisons. Tout d'abord, parce que les patients septiques ont un taux élevé de TNF- $\alpha$ , et qu'une association a été rapportée entre une augmentation du taux plasmatique de TNF- $\alpha$  et une augmentation de la mortalité. Ensuite, le blocage de TNF- $\alpha$  s'est montré bénéfique dans différents modèles animaux de sepsis. Enfin, car l'injection de TNF- $\alpha$  dans des modèles animaux provoque un syndrome rappelant le choc septique (216). Capable d'orchestrer une cascade de sécrétion de cytokines, le TNF- $\alpha$  est considéré comme un régulateur de la production des cytokines (217).

L'IL-6 est une cytokine sécrétée par les cellules en réponse au LPS, IL-1 ou TNF- $\alpha$ . Le taux d'IL-6 plasmatique reste élevé au cours du sepsis et est corrélé avec d'autres indicateurs de sévérité (218). Contrairement au TNF- $\alpha$ , l'injection d'IL-6 n'induit pas un état de choc (219), il est plutôt connu comme responsable de la fièvre et des réponses de l'organisme en phase aigüe (214).

Le CCL5 (ou *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* RANTES) est une chimiokine libérée au cours de l'inflammation, responsable du recrutement des lymphocytes, des éosinophiles, des basophiles et des mastocytes (220). Il a comme récepteurs CCR1/CCR3 et CCR5. Le blocage de CCR5 a été largement étudié dans l'infection au VIH en raison de la découverte de son implication comme co-récepteur du virus. Par contre, le rôle de CCL5 et de ses récepteurs dans d'autres infections virales est moins clair. Les propriétés chimioattractantes de CCL5 entraînent un influx cellulaire qui pourrait endommager les tissus, alors qu'il pourrait aussi avoir des effets protecteurs pour l'hôte dans les phases précoces de l'infection. A cause de cette dualité d'effet, il est difficile de le considérer comme une cible en clinique (220). Dans l'inflammation chronique comme l'arthrite rhumatoïde, l'inhibition préventive de CCL5 diminue la sévérité de l'inflammation dans un modèle d'arthrite chez le rat (221), mais l'effet disparaît si l'inhibition se fait après l'induction du modèle. Dans le sepsis, curieusement, c'est la seule cytokine dont le taux est inversement corrélé à la sévérité de la pathologie. Comme les plaquettes sont une des sources de CCL5, la thrombopénie chez les patients en choc septique a été avancée comme expliquant cette diminution de CCL5. De plus, il faut souligner qu'il a surtout été observé dans le sepsis néonatal (222,223).

L'immunomodulation a été une des premières approches pour traiter le sepsis dans les années 90, avec des thérapies dirigées contre le TNF- $\alpha$  et l'IL-1, soit en administrant des anticorps monoclonaux ou des récepteurs solubles. Malgré l'obtention de résultats satisfaisants dans les modèles expérimentaux, notamment avec les anticorps anti-TNF- $\alpha$  (224–228), ces molécules n'ont pas réussi à diminuer le taux de mortalité chez les patients en choc septique. Une étude prospective internationale, menée dans 14 pays, a comparé l'administration d'un anticorps murin monoclonal anti-TNF- $\alpha$  (BAY-1351) chez des patients avec un sepsis par rapport à un placebo (étude INTERSEPT). L'administration d'anti-TNF- $\alpha$  n'a pas amélioré la mortalité à 28 jours, que ce soit chez les patients avec ou sans choc septique (229). Une étude menée en parallèle avec le même anticorps a aussi conclu à l'absence d'effet sur la mortalité à 28 jours chez les patients avec un sepsis (NORASEPT). Par contre, l'étude INTERSEPT a montré que

chez les patients en choc septique, les patients traités se remettaient plus rapidement du choc que le groupe sans traitement ( $p= 0,007$ ), avec un plus long délai d'apparition de la première défaillance d'organe ( $p= 0,03$ ) (229). Deux ans après, une étude randomisée, en double aveugle, multicentrique, a été réalisée pour évaluer l'effet de l'anticorps anti-TNF- $\alpha$  chez des patients en choc septique par rapport à un placebo, incluant 1879 patients dans 105 hôpitaux (étude NORASEPT II). Comme précédemment, l'anticorps anti-TNF- $\alpha$  n'a pas amélioré la survie à 28 jours (40,3 % chez les patients et 42,8 % chez le groupe placebo,  $p= 0,27$ ), une diminution de la coagulopathie (J7,  $p < 0,001$ ; J28,  $p = 0,005$ ) a cependant été remarquée chez les patients traités mais aucune amélioration sur la défaillance d'organe (230).

Plusieurs raisons ont été avancées pour expliquer cet inefficacité, notamment la physiopathologie complexe du sepsis, qui est un processus multifactoriel et il a été suggéré que l'inhibition d'une seule cytokine n'est peut être pas suffisante (231).

#### **4) Rôle des inhibiteurs physiologiques de la coagulation dans le sepsis – Modulation pharmacologique**

La production de thrombine au cours du sepsis va entraîner l'activation, puis la consommation, des mécanismes physiologiques de régulation de la coagulation. Ainsi, les patients en choc septique ont une baisse du taux plasmatique des inhibiteurs physiologiques de la coagulation, notamment de l'antithrombine, de la protéine C et de la protéine S (232). En prenant en compte le potentiel amplificateur de la coagulation sur l'inflammation, et les méfaits d'une CIVD chez les patients en choc septique, l'administration d'anticoagulants physiologiques a été proposé pour traiter les patients, d'autant plus que ces protéines s'avèrent avoir des propriétés anti-inflammatoires indépendantes de leur propriétés anticoagulantes.

##### **a) L'antithrombine**

Le taux d'AT baisse chez les patients en choc septique (déficit en AT dans  $> 80$  % des patients) et est associé à un mauvais pronostic (233). Outre son effet puissant sur la coagulation, elle possède des propriétés anti-inflammatoires directes en inhibant le chimiotactisme des leucocytes, ou indirectes en se liant aux glycosaminoglycanes et induisant la production de prostacycline (234). En 2006, une étude de phase 3 (Kybersept) multicentrique en double aveugle, a été réalisée pour déterminer si l'administration d'une forte dose d'AT (30000 UI sur 4 jours) améliorerait la survie des patients en choc septique, comparée à un placebo ( $n = 2314$ ). Il n'y avait pas d'effet significatif de l'AT sur la mortalité à 28 jours (36,9 % dans le groupe AT contre 40,7 % dans le groupe placebo). En revanche, les

saignements étaient significativement plus fréquents chez les patients traités (24,1 % dans le groupe AT contre 12,9 % dans le groupe placebo,  $p < 0,0001$ ) (235). Wiedermann et coll. ont noté que la co-administration d'héparine chez les patients limitait l'effet anti-inflammatoire de l'AT, et ont observé que dans le sous-groupe de patients avec une CIVD, l'administration d'AT était bénéfique sur la mortalité (236). En 2016, une méta-analyse comprenant 30 études cliniques randomisées incluant 3933 patients a conclu que l'AT n'a pas d'effet sur la mortalité (RR 0,95, 95 % IC 0,88-1,03) même chez les patients avec une CIVD ( $n = 2858$ , RR 0,95, 95 % IC 0,88-1,03), et que l'AT augmente le risque hémorragique (RR 1,58, 95 % IC 1,35-1,84) (237). Ces résultats ont encore été remis en cause, suggérant un biais dans l'inclusion des études pour la méta-analyse (238), mais indiscutablement, l'amélioration sur la survie apportée par l'AT dans le choc septique, si elle existe, est faible et il y a un réel risque de complications hémorragiques chez les patients.

#### b) La protéine C activée (PCa)

La PCa exerce un effet anticoagulant en protéolysant les facteurs Va et VIIIa mais exerce aussi des activités protectrices (anti-apoptotiques) sur les cellules endothéliales, en se fixant sur son récepteur endothélial (EPCR) et en clivant le PAR1 (239). Dans les modèles animaux de sepsis, la PCa réduit l'inflammation, l'hypotension et réduit significativement la mortalité (240). Le taux plasmatique de la PC baisse au cours du choc septique (déficit en PC dans 80 % des cas) (241). La PCa humaine recombinante (Drotrecogine alfa activée, Xigris®) a par la suite été évaluée dans l'essai clinique multicentrique PROWESS pour le traitement du sepsis sévère chez 850 patients par rapport à 840 personnes dans le groupe placebo, au cours duquel une réduction de risque de mortalité de 6,1 % à 28 jours a été observée (241). Cette diminution de la mortalité est plus importante chez les patients aux stades les plus sévères, une réduction de 40,3 % à 30,5 % de la mortalité étant observée chez les patients avec une CIVD. Ainsi en 2002, le Xigris® a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en Europe pour le traitement du sepsis sévère.

Une autre étude publiée en 2012 (PROWESS-SHOCK) n'a malheureusement pas confirmé la réduction de taux de mortalité à 28 jours chez 846 patients, mais une fréquence accrue de saignements (5,6 % des patients traités *versus* 3,5 % chez les patients non traités,  $p = 0,003$ ) a été observée (242), ce qui a conduit au retrait du Xigris® du marché. Par la suite, une méta-analyse a été réalisée par Kalil et coll., incluant 9 études cliniques contrôlées (41401 patients), 16 études d'efficacité (5822 patients) et 20 études de sécurité d'utilisation (8245 patients). La

méta-analyse a conclu à une diminution significative de la mortalité (18 %), mais la présence de complications hémorragiques graves (5,4 %) lors de l'utilisation de la PCa comparé au placebo (243).

La protéine C zymogène a aussi été testée dans le choc septique, une étude randomisée, en double aveugle a comparé son effet par rapport à un placebo. L'étude a été arrêtée avant son terme car la mortalité sur 28 jours était de 79 % dans le groupe traité (15 patients) et 67 % dans le groupe placebo (12 patients) (244)

### c) La thrombomoduline (TM)

En plus de son activité anticoagulante permettant la génération de PC activée, la TM interfère avec l'activation du complément et inactive le *high-mobility group protein B1* (HMGB1), un médiateur associé à la mortalité dans le sepsis (245). L'expression de TM à la surface des cellules endothéliales diminue chez les patients en choc septique, pouvant ainsi contribuer au développement des CIVD (246). La supplémentation en TM a donc été testée en thérapeutique.

Une étude clinique de phase IIb a été réalisée pour évaluer la sécurité d'utilisation et l'efficacité de la thrombomoduline recombinante humaine (rhTM) chez des patients septiques avec une suspicion de CIVD. La mortalité à 28 jours était de 17,8 % dans le groupe rhTM et 21,6 % dans le groupe placebo ( $p = 0,273$ ), mais il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes sur la défaillance des organes ou l'augmentation des marqueurs d'inflammation (247). Par contre, le groupe rhTM ne présentait pas plus de saignement que le groupe contrôle, et l'effet le plus important du rhTM était observé sur les patients avec au moins un organe défaillant et une *international normalized ratio* INR > 4. Ainsi, une étude clinique de phase III est en cours (248).

Au Japon, une étude clinique de phase III en double aveugle a montré que le traitement par la rhTM améliorait le score de CIVD et diminue les saignements chez des patients avec CIVD associée à un sepsis, en comparaison à l'héparine (249). Ainsi, la rhTM a l'AMM au Japon pour le traitement des CIVD dans le choc septique. En 2016, une méta-analyse a été réalisée par Hayakawa et coll. concernant l'utilisation du rhTM au Japon (le seul pays où il a l'AMM) chez les patients admis aux urgences avec un sepsis sévère ou un choc septique et développant une CIVD. Ils ont montré une association significative entre les 452 patients traités et la diminution de la mortalité toutes causes confondues (OR 0,757; 95 % IC 0,574-0,999,  $p =$

0.049), ainsi qu'une absence de différence sur la fréquence de saignement entre les patients traités et le groupe contrôle (250).

#### d) Le TFPI

Le TFPI inhibe le complexe FT-FVIIa et le FXa, et pourrait aussi avoir un rôle dans le maintien de l'intégrité vasculaire (251). Il a été montré qu'une absence de TFPI (soit chez des souris déficientes ou par l'administration d'un anticorps inhibiteur), entraîne une aggravation de l'inflammation pulmonaire secondaire à une instillation nasale de pneumocoques, mais reste sans effet sur la dissémination bactérienne ou l'inflammation systémique (252). Le TFPI recombinant a été étudié avec des résultats positifs dans différents modèles de sepsis chez les babouins (253,254). Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de ces effets ne sont toujours pas éclaircis.

Abraham et coll. ont fait une étude clinique de phase II, multicentrique, randomisée et en simple aveugle, pour comparer l'administration de deux doses de TFPI recombinant (rTFPI) chez 141 patients par rapport à un groupe placebo. La mortalité à 28 jours dans l'ensemble des groupes traités par le rTFPI était de 30 % contre 38 % dans le groupe placebo ( $p = 0,3$ ) (255). Encouragés par cette tendance, ils ont étudié en 2003 dans une étude de phase III randomisée, en double aveugle, l'effet du rTFPI (tifacogin) sur les patients avec un sepsis sévère, en comparant à un placebo. L'étude était multicentrique et divisée en deux groupes selon l'INR, 1754 patients ont été inclus dans le groupe avec un  $INR \geq 1,2$  et 201 patients avec une  $INR < 1,2$ . Le tifacogin n'a pas eu d'effet bénéfique sur la mortalité à 28 jours, et comme avec les autres anticoagulants, les patients traités présentaient une augmentation du risque hémorragique quelque soit l'INR de départ (6,5 % tifacogin contre 4,8% placebo dans le groupe INR élevé; 6,0 % tifacogin contre 3,3 % placebo dans le groupe INR faible) (256).

### **5) Inhibition de la voie du système contact**

La voie du système contact n'est pas nécessaire pour avoir une hémostase physiologique alors que ses facteurs sont responsables d'une activation pathologique de la coagulation, ainsi les FXIIa et FXIa semblent être des cibles intéressants pour avoir un effet antithrombotique sans risque hémorragique (257,258). De plus, chez les patients en choc septique, la diminution de la génération de BK pourrait être bénéfique contre l'hypotension.

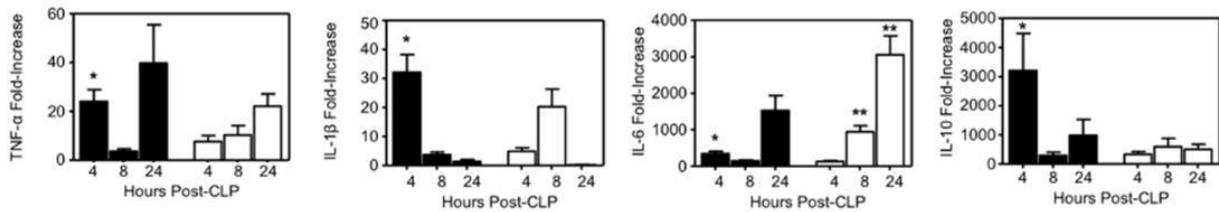
Le C1-inhibiteur (C1-inh) régule à la fois le système contact et la voie du complément. Il peut être inhibé par l'élastase libéré par les neutrophiles activés (259). Chez les patients en choc

septique, il y a une augmentation de l'inactivation et du clivage du C1-inh par rapport à des sujets sains, et la concentration de C1-inh clivé est corrélée positivement à la mortalité (260). Une étude multicentrique et randomisée a été réalisée en 2012 sur des patients avec un sepsis, évaluant l'effet d'une administration de C1-inhibiteur en plus des traitements classiques. Sur les 61 patients de l'étude, l'administration de C1-inhibiteur améliorait la survie à 28 jours en considérant toutes les causes de mortalité (mortalité 12 % vs 45 dans le groupe contrôle,  $p = 0,008$ ) (261). Cependant, il n'y a pas eu d'autres études avec un effectif plus important réalisé pour pouvoir apprécier l'effet du C1-inhibiteur.

Pour l'inhibition du FXIIa, un anticorps monoclonal dirigé contre le FXIIa (C6B7) a été testé dans un modèle d'injection d'*E.coli* létale chez le babouin. Une diminution d'IL-6 et d'élastase neutrophile est retrouvée dans le groupe traité, ainsi que l'absence d'hypotension prolongeant la survie. Par contre, les deux groupes ont développé une CIVD et présentaient un taux plaquettaire faible, une baisse de fibrinogène et de FV (262). En 2014, Larsson et coll. ont produit et caractérisé un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le FXIIa (3F7) qui empêche la formation de thrombus dans un modèle de thrombose chez la souris et le lapin (263). Le 3F7 empêche la formation de caillot dans un modèle d'oxygénation extracorporelle (ECMO) chez le lapin, comme l'héparine utilisé en contrôle. Cependant, contrairement à l'héparine, il n'augmente pas les saignements suite à une blessure chez le lapin (263). L'anticorps, à ma connaissance, n'a pas encore été testé dans un modèle de choc septique.

### Inhibition du FXI

L'anticorps monoclonal anti-FXI (14E11) bloque l'activation du FXI par le FXIIa (mais n'inhibe pas l'activation du FXI par la thrombine). Il a été étudié chez la souris dans un modèle de choc septique induit par ligature et ponction caecale (LPC). L'administration de l'anticorps dans les 12 h après la LPC améliore la survie chez les souris traitées, sans induire de tendance hémorragique (264). Bane et coll. ont par la suite montré que les souris déficitaires en FXI avaient une diminution du taux plasmatique de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-10 4h après la LPC en comparaison avec des souris « sauvages » (Figure 26), ce qui leur conférait un gain de survie (265). De façon inattendue, le système contact n'est pas activé chez les souris déficitaires en FXI, contrairement aux souris « sauvages » où une diminution du FXII et de la PK est observée, ce qui suggère un rôle central du FXI dans l'activation du système contact (265).



**Figure 25 : Taux plasmatiques des cytokines secrétées après ligature et ponction caecale (LPC) chez des souris « sauvages » ou déficitaires en facteur XI.**

Variations des taux plasmatiques de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-10 chez les souris « sauvages » (en noir) et les souris déficitaires en FXI (en blanc) par rapport aux souris contrôles (groupe « Sham »).  $n = 8$  ou  $9$  dans chaque condition et  $n = 3$  souris Sham. Une augmentation significative des taux de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-10 est constatée chez les souris « sauvages » par rapport aux souris déficitaires en FXI 4h après la LPC. Une augmentation du taux d'IL-6 chez les souris « sauvages » est observée par rapport aux souris déficitaires en FXI après 8h et 24h de la LPC.

Par ailleurs, une protéine de fusion contenant un anticorps anti-CD14 (qui bloque le récepteur au LPS) et un domaine inhibant le FXIa (MR1007) améliore la survie dans un modèle de sepsis chez le lapin, sans augmenter l'apparition de saignement spontané (266).

Inversement en 2017, Stroo et coll. en induisant un sepsis par inoculation intranasale de *Streptococcus pneumoniae* (Gram +) et *Klebsiella pneumoniae* (Gram -) à des souris déficitaires en FXI dans un modèle de pneumonie. Ils ont observé que les souris déficitaires en FXI avaient une diminution de la survie, expliquée notamment par une prolifération plus importante des bactéries et une diminution de la capacité des neutrophiles à les phagocyter (267). Ces résultats contradictoires peuvent être dus à la différence de modèle d'induction du sepsis.

## 6) Le système PZ/ZPI et sepsis

En 2013, Butschkau et coll. ont effectué un modèle de sepsis par injection de LPS par voie intraveineuse à des souris déficitaires en PZ ou ZPI. Ils ont montré que l'absence de PZ modifiait la réponse inflammatoire chez la souris, notamment par une augmentation des cytokines IL-6 et IL-10 et l'aggravation de l'infiltration leucocytaire (268). De plus, les souris déficitaires en ZPI présentaient une forte proportion d'occlusions vasculaires comparées aux souris « sauvages », ce qui n'est pas le cas des souris déficitaires en PZ. Cette observation suggère l'importance de l'inhibition du FXIa dans ce modèle. En somme, le système PZ/ZPI pourrait avoir un rôle protecteur dans le développement d'un choc septique, que ce soit sur l'atténuation de l'inflammation ou sur la coagulopathie.

Des dosages d'AT, de PC, de PS et de PZ ont été effectués chez des patients atteints de sepsis ou d'infection sévère avec une suspicion de CIVD. Une diminution du taux plasmatique des 4 protéines analysées a été rapportée, faisant sûrement suite à leur consommation. Les 126 patients étudiés avaient un taux effondré de PZ, à 1,4 % chez les patients avec une suspicion de CIVD (n = 71) et 1 % quand la CIVD est cliniquement observée (n = 55). La diminution du taux plasmatique de PZ n'avait pas de valeur prédictive de la CIVD, contrairement à la PC et l'AT dont la diminution des taux plasmatiques était corrélée au score de la CIVD (269).

Chez l'homme, une étude *in vitro* a analysé l'effet du rajout de PZ ou TM dans les plasmas de patients avec une CIVD dans un test de génération de thrombine (TGT) (n = 152). Alors que les différents paramètres fournis par le TGT ne sont pas significativement différents entre patients avec CIVD décompensée ou non, ou entre patients qui vont survivre ou décéder, ils montrent qu'en présence de PZ, le « *time-to-peak* », c'est-à-dire le temps mis par le plasma pour atteindre le pic de formation de la thrombine est significativement plus long chez les patients qui ont une CIVD décompensée (18,6 min vs 15,3 min,  $p < 0,05$ ). De même avec, le « *lag-time* » (c'est-à-dire le temps mis pour que débute la coagulation) et le « *time to peak* » étaient significativement plus allongés avec les plasmas des patients qui sont décédés (« *lag time* » 14,5 min vs 11,3 min,  $p < 0,05$  et « *time-to-peak* » 19,0 min vs 15,3 min,  $p < 0,05$ ) qu'avec les plasmas des patients ayant survécu (270). En revanche, l'ajout de TM, qui explore la voie de la Protéine C, n'avait pas de caractère discriminant. Les auteurs ont en concluent que leur étude montre donc un défaut du système PZ/ZPI lors du sepsis et que l'ajout de PZ dans le TGT pourrait permettre de discriminer les patients avec un mauvais pronostic, suggérant un défaut du système PZ/ZPI chez ces patients.

En 2010, Sipahi et coll. ont étudié la fréquence du polymorphisme G79A de la protéine Z, qui est responsable d'une diminution de son taux plasmatique, chez les patients avec un sepsis sévère dans une cohorte de 53 patients et 70 volontaires sains. Les auteurs ont trouvé que la fréquence de G79A était comparable chez les patients et les contrôles, 43,4% et 40% respectivement. Par contre, l'allèle A est plus fréquente chez les patients, elle est retrouvée chez 3 patients et seulement chez un volontaire sain. Il a ainsi été conclu que les patients 79AA ont 4,5 fois plus de risque de développer un sepsis sévère (95% IC : 0,45-46,1), sans qu'il y ait un effet sur la mortalité (271).

# Résultats



## **Objectifs de mon travail**

Le ZPI est une protéine appartenant à la superfamille des serpins, c'est un inhibiteur physiologique de la coagulation isolé il y a une vingtaine d'années. Chez la souris, l'induction de l'inflammation par injection de turpentine entraîne une augmentation rapide du taux plasmatique de ZPI, avec un pic atteint deux jours après l'injection. Ainsi, le ZPI est considéré comme une protéine positive de la phase aiguë de l'inflammation. Cette observation est retrouvée chez l'Homme, notamment chez des patientes après une chirurgie gynécologique, où une augmentation significative (environ 20 %) du taux plasmatique du ZPI est observée. De nombreuses protéines de l'inflammation sont décrites comme ayant des propriétés immunorégulatrices, dont l'alpha1-antitrypsine (AAT), qui appartient aussi à la superfamille des serpins comme le ZPI.

La première partie de mon travail a consisté ainsi à rechercher un effet immunorégulateur du ZPI. Pour ce faire, un modèle *in vitro* avec du sang total a été choisi, permettant de prendre en compte toutes les interactions cellulaires entre les cellules sanguines. Le sang est stimulé par du lipopolysaccharide induisant une sécrétion de médiateurs de l'inflammation. Nous avons étudié les variations des cytokines par l'utilisation de puces recouvertes d'anticorps permettant l'identification simultanée de 25 cytokines. Les variations que nous avons détectées *in vitro* ont été recherchées *in vivo*, dans un modèle d'endotoxémie chez la souris, par injection intra-péritonéale de LPS.

La deuxième partie de mon travail a porté sur l'effet de la NETose sur le ZPI. En effet, de nombreux anticoagulants sont inactivés par les protéases à la surface des NETs, comme l'antithrombine, le TFPI ou la protéine S, participant à l'activation locale de la coagulation.

Enfin, j'ai fait une étude observationnelle sur les variations des taux plasmatiques du ZPI et de la PZ, sur une cohorte de 100 patients en choc septique. Les taux de PZ et ZPI ont été mesurés pendant une semaine, et nous avons analysé si les taux plasmatiques de ZPI et/ou PZ pouvaient aider à discriminer les patients qui vont développer ou non la CIVD et présenter une valeur pronostique sur la mortalité à 28 jours.



## 1<sup>ère</sup> partie : Démonstration d'un effet anti-inflammatoire du ZPI

Le ZPI est un inhibiteur physiologique de la coagulation, il inhibe le facteur XIa (FXIa) seul et nécessite la PZ, un facteur vitamine K-dépendant, pour inhiber le facteur Xa (FXa). Il circule dans le plasma à une concentration moyenne de 62,5 nM dont environ 60 % est en complexe avec la PZ. Les souris déficitaires en ZPI ou PZ ont une réaction inflammatoire accrue suite à l'induction d'inflammation systémique par injection de LPS, par rapport aux souris « sauvages » (268). Le système PZ/ZPI, en plus de ses propriétés anticoagulantes, pourrait donc être impliqué dans l'inflammation.

L'effet anti-inflammatoire du ZPI recombinant humain (rhZPI) a été évalué dans un modèle en sang total stimulé par le lipopolysaccharide (LPS). Nous avons ainsi observé que le rhZPI diminuait plusieurs cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , ainsi que des chemokines (MIP). Nous avons essayé de caractériser les relations structure-activité dans cet effet, en analysant si la PZ et l'héparine non fractionnée, cofacteurs du ZPI pour son activité anticoagulante, pouvaient amplifier son effet anti-inflammatoire. De même, un variant du ZPI muté au niveau de sa boucle réactive (ZPI Y387A), qui perd ainsi son activité anticoagulante, a été produit afin de savoir si le ZPI a une activité anti-inflammatoire indépendante de son activité anticoagulante.

Nous avons observé également, que de façon inattendue, le rhZPI induit la sécrétion de CCL5 (RANTES) une cytokine sécrétée par les lymphocytes activés et qui peut moduler la production de cytokines proinflammatoires par les monocytes activés. La nécessité de production de CCL5 par les lymphocytes pourrait expliquer, que l'effet anti-inflammatoire du rhZPI ne peut être mis en évidence sur une préparation de monocytes purifiés, alors qu'il est observé en utilisant des cellules mononuclées (mélange lymphocytes-monocytes). La présence d'un composant plasmatique semble également être nécessaire pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire du ZPI, toutefois il ne semble pas que l'effet anti-inflammatoire passe par l'inhibition des facteurs XIa ou FXIIa.

L'effet anti-inflammatoire du ZPI observé *in vitro* a été confirmé *in vivo* dans un modèle d'injection de LPS par voie intra-péritonéale chez la souris, l'administration simultanée de rhZPI au LPS induisant une diminution du taux plasmatique d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ . De même, dans le liquide de lavage péritonéal, on observait une augmentation de CCL5.

Les propriétés anti-inflammatoires du ZPI pourrait être particulièrement intéressante dans le cadre du choc septique, inflammation généralisée initiée par la présence d'un pathogène dans la circulation sanguine et souvent compliquée par l'apparition de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), pouvant conduire à une défaillance multiviscérale et au décès du patient. L'antithrombine et la protéine C activée, deux inhibiteurs physiologiques de la coagulation ayant des propriétés anti-inflammatoires indépendantes de leur activité anticoagulante ont déjà été utilisés pour traiter le choc septique. Cependant, leur utilisation a été accompagnée d'une augmentation du risque hémorragique sans une amélioration significative de la survie. Les résultats obtenus avec le rhZPI sont en accord avec les données de la littérature montrant que l'inhibition du FXIa atténuait l'inflammation et la coagulopathie dans un modèle de choc septique chez la souris (264), l'inhibition du FXIa semblant être associée à un risque hémorragique faible. Toutefois il semble qu'il existe en plus des propriétés intrinsèques au ZPI qui lui confèrent une activité anti-inflammatoire. Enfin, les thérapeutiques qui ont visé à bloquer une cytokine (IL-1 ou TNF- $\alpha$ ) se sont montrées décevantes, soit parce que bloquer une seule cytokine est insuffisant, soit parce que l'inhibition complète d'une cytokine ne permet pas de maintenir une réaction inflammatoire, nécessaire à l'organisme pour se défendre. Le ZPI, en faisant baisser simultanément plusieurs cytokines et chemokines, mais en n'inhibant pas totalement la réaction inflammatoire, pourrait donc être un outil thérapeutique adjuvant intéressant dans le sepsis, en abaissant le niveau de la réaction inflammatoire avec un risque hémorragique modéré.

**The Protein Z-dependent protease inhibitor has an *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity**

Mahita Razanakolona<sup>1</sup>, Frédéric Adam<sup>1</sup>, Elsa Bianchini<sup>1</sup>, François Saller<sup>1</sup>, Allan de Carvalho<sup>1</sup>, Jean-Luc Diehl<sup>2</sup>, Cécile Denis<sup>1</sup>, Ferhat Meziani<sup>3</sup>, Delphine Borgel<sup>1,4</sup>, Julie Helms<sup>3</sup>, Marc Vasse<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> HITh, UMR\_S1176, INSERM, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 94276, Le Kremlin-Bicêtre cedex, France

<sup>2</sup> Département de réanimation médicale, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France.

<sup>3</sup> Service de Réanimation, Université de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France.

<sup>4</sup> APHP, Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Paris, France

<sup>5</sup> Service de Biologie Clinique, Hôpital Foch, Suresnes, France

Corresponding author : Pr Marc Vasse, UMR-S 1176, Hôpital du Kremlin-Bicêtre, 78 rue du général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France, marc.vasse@u-psud.fr

## **Summary** (200 words)

The protein Z-dependent plasma protease inhibitor (ZPI) is a glycoprotein that inhibits factor XIa. In the presence of Protein Z (PZ), ZPI inhibits also FXa. Recently, ZPI has been shown to be an acute phase protein (APP). As usually APPs down-regulate the harmful effects of inflammation, we tested whether ZPI could modulate the increase of cytokines observed in inflammatory states. We observed that ZPI decreases significantly the levels of IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  induced by lipopolysaccharide (LPS) in a whole blood model. This inhibitory effect was unaffected by the presence of PZ, heparin, and a mutant on the reactive loop center ZPI (Y387A), lacking anticoagulant activity, had still an anti-inflammatory activity. Surprisingly, ZPI did not inhibit the synthesis of IL-6 or TNF- $\alpha$  when purified monocytes were stimulated by LPS, whereas the inhibitory effect was evidenced when lymphocytes were added to monocytes. The requirement of lymphocytes could be due to the synthesis of CCL-5 (RANTES), a chemokine mainly produced by activated lymphocytes which is induced by ZPI, and which can reduce the production of pro-inflammatory cytokines in whole blood. Lastly, we observed that the intraperitoneal injection of ZPI with LPS decreased significantly plasma levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in mice.

**Keywords** : protein Z-dependent plasma protease inhibitor, pro-inflammatory cytokines, CCL-5, lipopolysaccharide, monocytes

## Introduction

The protein Z-dependent plasma protease inhibitor (ZPI) is a member of the serpin superfamily, identified in human plasma that produces rapid inhibition of factors Xa (FXa) and XIa (FXIa). The inhibition of FXa requires the presence of Protein Z (PZ), a vitamin K-dependent factor, which increases more than 1000-fold the inhibition rate of FXa. In contrast, the binding of PZ to ZPI reduces the rate and extent of factor XIa inhibition produced by ZPI but unfractionated heparin enhances the rate and the extent of factor XIa inhibition by ZPI. During its inhibitory interaction with factor Xa and factor XIa, ZPI is proteolytically cleaved with the release of a 4.2-kd peptide (Han *et al.*, 2000). PZ and ZPI circulate as a complex in both human and mouse plasma but in man, there is excess of free ZPI, whereas in the mouse there is an excess of free PZ (Tabatabai *et al.*, 2001; Girard *et al.*, 2013). ZPI-deficient mice exhibit a higher frequency of thrombosis following arterial injury and an increased mortality from pulmonary thromboembolism following collagen/epinephrine infusion than wild-type mice (Zhang *et al.*, 2008). However, the consequences of a ZPI deficiency in humans remain uncertain (Al-Shanqeeti *et al.*, Corral *et al.*, 2007).

Recently, it was shown that subcutaneous injection of turpentine in mice induced an approximately 3-fold increase in both ZPI mRNA and plasma levels, indicating that ZPI is an acute phase reactant. In contrast, PZ mRNA were not affected, and the 2-fold increase of plasma PZ levels, which appeared 2 days after the increase of plasma ZPI levels, was attributed to a prolongation of the PZ half-life when it circulates in complex with ZPI (Girard *et al.*, 2013).

It is now evident that acute phase reactants play a role in minimising the harmful effects of inflammation in host tissue. For example, alpha-1 antitrypsin (AAT) is an acute phase protein belonging to the serpin superfamily (Kalsheker *et al.*, 2002). The importance in its role is highlighted by the development of emphysema and other inflammatory conditions in individuals with AAT deficiency (Richmond & Zellner, 2005). It has been suggested that the increase in AAT levels during acute inflammation may not only be protective to the host through blocking excessive serine proteinase activity, but also by regulating the expression of pro-inflammatory cytokines (Janciauskiene *et al.*, 2004). Therefore, this prompted us to analyse whether ZPI, in addition to its coagulation regulatory activity, could have a role in dampening excessive inflammatory response.

## Materials & Methods

### *Reagents*

Lipopolysaccharide (LPS) was from *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Purified PZ was from Hyphen-Biomed (Neuville-sur-Oise, France). After reconstitution, it was dialyzed against phosphate buffer saline (PAN Biotech, Germany). Unfractionated heparin (UFH) was from Sanofi-Aventis (France). Purified FXIa and FXa were from Enzyme Research Laboratories (Stago-BNL, The Netherlands). Congenital deficient plasmas were from George King Bio-medical (Cryopep, France).

### *Production and purification of recombinant human ZPI and ZPI (Y387A)*

Human ZPI cDNA (NCBI, NM\_001100607.2) was cloned into the NotI and BamHI site of pCEP4 vector (NeoBiotech, Nanterre, France). ZPI Y387A cDNA was provided by ProteoGenix (France), PCR-base site-directed mutagenesis with pCEP4-ZPI (WT) as template was used to change the codon for Y387 (TAT) of ZPI into that of alanine (GCT), and mutation was confirmed by sequencing the ZPI cDNA. Then, pCEP4-ZPI (WT) and pCEP4-ZPI (Y387A) were amplified in One Shot™ Top10 *E.coli* (ThermoFisher, France) according to the manufacturer's instructions.

FreeStyle™ 293-F cells (Invitrogen, France), grown in F17 medium supplemented with 2mM Glutamin, 0.1 U/mL Penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin, were transfected with pCEP4-ZPI (WT) or pCEP4-ZPI (Y387A) by liposome-mediated transfection. Briefly, 200 mL of cells were transfected with 200 µg of plasmid DNA by polyethylenimine (PEI) on Optimem medium. After 7 days of cells cultured in supplemented F17 medium, the media was collected and centrifuged to remove cells, supernatants were purified.

Recombinant human ZPI (rhZPI) WT and rhZPI (Y387A) were purified similarly from media by two successive chromatography steps on Heparin-Sepharose (GE Healthcare, France) and ResourceQ™ (GE Healthcare). Briefly, 600 mL of media containing the rhZPI were applied at a flow rate of 5 mL/min to a 5 mL Heparin-Sepharose column equilibrated in 0.1 M NaCl, 0.02 M MES, 0.001 M EDTA pH 6.3 at 20°C. The column was washed with 50 mL equilibrium buffer and then eluted with 20 mL linear gradient from 0.1 M NaCl to 0.6 M NaCl in the same buffer.

Fractions corresponding to the pic (between 0,3 and 0.4 M of NaCl) on chromatograph were pooled and dialyzed against 0.015 M NaCl, 0.02 M MES, 0.001 M EDTA pH 7.4 at 4°C. ResourceQ™ column: dialyzed pooled fractions from previous step was applied at flow rate 1

mL/min to a 1 mL ResourceQ™ column equilibrated in 0.02 M NaCl, 0.02 M MES, 0.001 M EDTA pH 7.4 at 20°C. The column was washed with at least 10 mL of the same equilibrium buffer and eluted with 15 mL linear gradient to the same buffer containing 140 mM NaCl.

Fractions were selected by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and pooled fractions containing pure rhZPI were concentrated by ultrafiltration with a 30 000-Da cutoff membrane on PBS buffer. The inhibitory activity of rhZPI against factor XIa and FXa in presence of cofactors were evaluated to validate the batch.

#### *Whole blood assay*

Peripheral blood was collected from healthy donors with their informed consent, nine volumes into one volume of 3.2% trisodium citrate (BD vacutainer® tubes). Blood collected was diluted (1:1) in RPMI-1640 medium (ThermoFisher Scientific) supplemented with trisodium citrate (3.2%)

Ninety µL of diluted blood were incubated for 30 minutes at 37 °C and in a 5 % CO<sub>2</sub> humid atmosphere with the different proteins tested, in a volume of 10 µL in 96-well cell culture plate (VWR, France), before the stimulation by LPS (5 µL, at a concentration of 10 ng/mL). After a 4 h or 20 h incubation period at 37°C, whole blood was collected and centrifuged (2000 g, 10 min) and supernatants were stored at -20°C until cytokine dosages.

#### *Isolations of monocytes, platelets and polymorphonuclear neutrophils*

Peripheral blood was depleted in platelets by centrifugation at low speed (300 g, 10 min at room temperature), and platelet-rich-plasma was discarded, then peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from platelet-depleted-blood by Ficoll-Plaque™ PLUS centrifugation (GE Healthcare) at 300 g for 45 min. Cells were washed in RPMI 1640 medium, then resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (Gibco, France), 2 mM Glutamin, 100 U/mL Penicillin and 100 µg/mL streptomycin (ThermoFisher, France). In 96-well cell culture plate, 90 µL of PBMC suspension (10<sup>5</sup> cells/well) were pre-incubated 30 min with 10 µL of the proteins tested and stimulated with 5 µL of LPS for a final concentration of 1 ng/mL.

Monocytes were isolated from lymphocytes by adherence in 48-well cell culture plates (VWR). Briefly, PBMC (1.2x10<sup>6</sup> cells/well) were incubated 45 min at 37°C in a 5 % CO<sub>2</sub> humid atmosphere, then 2 times washed with PBS buffer. Isolated monocytes were cultured in 270 µL of complete RPMI-1640 medium or RPMI-1640 medium supplemented with

autologous plasma (10, 25 or 50%). Monocytes were pre-incubated for 30 min with 30  $\mu$ L of the proteins tested, and then stimulated with 15  $\mu$ L of LPS (at a final concentration of 1 ng/mL).

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) were isolated from fresh buffy coats prepared from blood of healthy donors. First, leukocytes were separated from erythrocytes by sedimentation on a separating medium containing 5% Dextran T500® (Pharmacia, Sweden) in 0.9% saline. PMN were separated from PBMC by centrifugation on Ficoll-Plaque™ PLUS. Contaminating erythrocytes were removed by hypotonic lysis ( $H_2O$ ), and PMN were resuspended in Hank's buffered salt solution (HBSS) (ThermoFisher Scientific) supplemented with 0.05% FBS and 10 nM Hepes (ThermoFisher Scientific).

For washed platelet preparation, venous blood was collected in 10 % ACD/A buffer (75 mM trisodium citrate, 44 mM citric acid, 136 mM glucose, pH 6) and D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine Chloromethyl Ketone PPACK (80  $\mu$ M), and washed platelets were prepared as described previously (Adam *et al.*, 2003)

#### *Proteome Profil Human Cytokine Array kit (R&D Systems, France)*

The kit was used according to manufacturer's instructions. Briefly, while nitrocellulose membranes containing different capture antibodies were incubated at room temperature with a blocking buffer, 200  $\mu$ L of plasma samples were incubated with biotinylated detection antibody to a final volume of 1.5 mL at room temperature for one hour. Then, block buffer was aspirated and samples were incubated with the membranes at 4°C overnight. Membranes were removed and washed three times for 10 min. Streptavidin-HRP was incubated with membranes for 30 min and after three washes, captured proteins are visualized using chemiluminescent detection reagents. This cytokine array kit detects simultaneously 28 cytokines and chemokines: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-16, IL-17E, IL-18, IL-21, IL-27, IL-32, MIF, MIP-1 $\alpha/\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL1, CCL2, CCL5, CXCL-1, CXCL-10, CXCL-11 and CXCL12.

#### *Measurement of cytokines/chemokines levels*

Human and murine cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$  and CCL-5) were measured using the specific ELISA Duosets assays (R&D System Bio-technique, Lille, France), according to manufacturer's instructions

### *LPS-induced inflammation in mice*

Housing and experiments were done as recommended by French regulations and the experimental guidelines of the European Community. This project was approved by the ethical committee CEEA26 under the number APAFIS#5994-201607061607594.v2.

Female wild-type (WT) C57Bl/6J mice (17-20g; 8-weeks-old) were purchased from Envigo (Gannat, France). The animals were maintained in pathogen-free conditions and handled according to national and institutional guidelines.

Inflammation was induced in 8-weeks-old mice by intra-peritoneal injection of LPS (0.1 mg/kg) in NaCl 0.9% or with rhZPI (90 µg or 180 µg). Blood was collected before and 2 hours after LPS administration on retroorbital and intracardiac ways respectively. Plasma was separated by centrifugation (20 minutes; 1500g) and stored at -20°C until analysis. Peritoneal lavage was performed with 2 mL PBS/1% BSA 2 hours after LPS administration.

### *Statistical analysis*

Graphpad Prism 6 was used for statistical tests. Repeated measures were analyzed with ordinary ANOVA including Dunnett or Bonferroni post test for multiple comparisons. Student *t* test was used when only two groups of mice were compared each other. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

*Recombinant human ZPI inhibits the synthesis of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and Macrophage Inhibitory Protein-1 (MIP-1) but increases the production of the chemokine CCL-5 (RANTES, Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted).*

In order to identify a possible effect of rhZPI on the production of mediators of inflammation in LPS-stimulated whole blood, we used a protein micro-array which allows the simultaneous detection of 36 mediators of inflammation. Whole blood was incubated for 4 hours in the presence of LPS (controls), LPS (10 ng/mL) or rhZPI (250 nM) or both LPS and ZPI. In controls, no cytokines or chemokines were detected by the array, but surprisingly, in addition, ZPI alone induced a significant increase of CCL-5 (fig 1). In the presence of LPS, a significant production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1RA, MIF, MIP-1 and CCL-5 was observed. The production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and MIP-1 was significantly decreased in the presence of rhZPI, whereas the induction of CCL-5 by LPS was enhanced by ZPI (fig 1) The secretion of IL-1RA and MIF induced by LPS was unaffected by ZPI.

*Recombinant human ZPI dose-dependently decreases the production of IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated whole blood.*

In order to confirm and characterize the inhibitions of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  observed on the array, increasing concentrations of rhZPI (from 62,5 to 250 nM), corresponding to 1 to 4-fold physiological concentrations of plasma ZPI, were added in whole blood, 30 min before the addition of LPS (10 ng/mL). After a 20 hours incubation, plasma levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  were quantified. IL-6 and TNF- $\alpha$  were significantly dose-dependently decreased, with a significant inhibitory effect observed from 125 nM of rhZPI (Fig 2A & 2B). This inhibitory effect was also observed when a shorter incubation time (4 hours) was chosen (Fig 2C & 2D).

*Effects of purified PZ or unfractionated heparin (UFH) on the inhibitory effect of rhZPI on the production of IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated whole blood.*

As ZPI forms a complex with PZ, and as some biological effects of ZPI are potentiated by PZ (for example the inhibition of FXa), we evaluated if the down-regulation of IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated whole blood was dependent of the presence of PZ. Increasing

concentrations of purified PZ alone, from 62.5 to 250 nM had no significant effect on the production of IL-6 or TNF- $\alpha$  (table 1). At the lowest concentration tested (62.5 nM), rhZPI alone has no significant inhibitory effect on the production of IL-6 or TNF- $\alpha$ , but in the presence of an equimolecular concentration of PZ (62.5 nM), a significant inhibitory effect was observed on the secretion of TNF- $\alpha$  (table 1). For the higher concentrations of rhZPI, the addition of PZ did not further increase the inhibitory effect of ZPI.

It has been observed that UFH increases the inhibitory capacity of ZPI towards FXIa. Therefore, we analysed if the addition of UHF influences the inhibitory effects of ZPI on the production of IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated whole blood. Increasing concentrations of UHF up to 0.6 U/mL had no significant effect of the inhibitory effect of ZPI (data not shown).

*The inhibitory effect of ZPI on the production of IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated whole blood is conserved using the rhZPI (Y387A)*

Tyrosine 387 has been shown to be the P(1) residue at the reactive center of the ZPI molecule and rhZPI(Y387A), a form of ZPI in which tyrosine 387 has been changed to alanine, lacks PZ-dependent factor Xa and factor XIa inhibitory activity (Han *et al.*, 1999, Han *et al.*, 2000). To analyse the importance of the reactive centre loop (RCL) of ZPI, we studied the effects of the rhZPI(Y387A) on the proinflammatory cytokines production in LPS-stimulated whole blood. As shown on fig 3, rhZPI(Y387A) had a significant inhibitory effect on the production of IL-6 and TNF- $\alpha$  induced by LPS in whole blood. The inhibitory effect of the variant was slightly weaker than the inhibitory effect of rhZPI. The rhZPI(Y387A) inhibited also the secretion of pro-inflammatory cytokines when the incubation period was decreased to 4 hours (data not shown). Taken together, these data suggest that the RCL contributes, in part, to the anti-inflammatory activity of rhZPI, but that most of anti-inflammatory activity is independent of the RCL.

*The inhibitory effects of rhZPI is observed even when it is added after LPS stimulation.*

In our first experiments, we added before the stimulation by LPS. Therefore, we checked whether ZPI could have an inhibitory effect even after the stimulation of blood by LPS. As it can be seen on figure 4, the inhibitory effect of ZPI on the production of IL-6 and TNF- $\alpha$  on LPS-stimulated whole blood was still significant when ZPI was added 1 hour after the addition of LPS. This effect disappeared when ZPI was added 4 hours after LPS stimulation.

*The inhibitory effect of ZPI on cytokine production by LPS activated monocytes requires a cellular cooperation and the presence of plasma.*

In order to better characterize the mechanisms of the inhibitory effect of rhZPI on the production of pro-inflammatory cytokines induced by LPS, we analysed the effects of ZPI on purified cells. Surprisingly, ZPI was unable to inhibit the production of IL-6 or TNF- $\alpha$  by purified monocytes stimulated by a weak concentration (1 ng/mL) of LPS (data not shown). The inhibitory effect of ZPI was only seen when it was added on peripheral blood mononuclear cells (PBMC), (fig 5-A) suggesting that a cooperation between lymphocytes and monocytes is needed. In contrast, ZPI was inefficient to inhibit the cytokine production induced by LPS when monocytes were co-incubated with washed platelets or purified polymorphonuclear (data not shown). Lastly, a weak but significant inhibitory effect of ZPI on cytokine production by LPS-stimulated monocytes was observed in the presence of plasma (fig 5 B), but only on the IL-6 production, suggesting that ZPI antiprotease activity could be involved in its inhibitory activity on cytokine production. As ZPI, in the absence of PZ, inhibits only FXIa, we tested if the anti-inflammatory activity of the rhZPI was related to its inhibition of FXIa. However, the inhibitory effect of rhZPI was still observed when FXI deficient plasma was used instead of normal plasma. We studied also plasmas deficient in factor XII, FVIII were also studied the inhibitory effect of rhZPI was also observed (fig 5C).

*Administration of recombinant human ZPI to mice inhibits the increase of plasma levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  induced by intraperitoneal injection of LPS*

Lastly, we evaluated whether the *in vivo* administration of ZPI to mice could counterbalance the inflammatory response induced by LPS. Mice were injected intraperitoneally (i.p) with 0.1 mg/kg of LPS, alone or in combination with increasing doses of ZPI (90 or 180  $\mu$ g). A significant decrease of plasma TNF- $\alpha$  was observed at the dose of 90  $\mu$ g, plasma IL-6 was only decreased at the highest dose tested (fig 6A). There was a trend to a decrease of plasma MCP-1, which was not statistically significant. As observed in the whole blood model, i.p injection of ZPI induced a significant secretion of CCL-5 in peritoneal lavage, but it did not enhance the production of CCL-5 induced by LPS alone (fig 6B).

## Discussion

In the present work, we describe that the serpin ZPI exerts an anti-inflammatory activity, both *in vitro* and *in vivo*. This effect requires high concentrations of ZPI, since, *in vitro*, the maximal effect on IL-6 and TNF- $\alpha$  was observed at a 4-fold physiological concentration. The serpin antithrombin (AT) has been shown to exerts anti-inflammatory activity *in vitro* at very high concentrations (20 UI/mL) (Oelschläger et al., 2002) and these high doses required *in vivo* to reverse organ dysfunction in sepsis are associated with an increased bleeding tendency (Hayakawa et al., 2016). Similarly, *in vitro*, activated protein C (aPC) was shown to have anti-inflammatory properties at 20-fold the physiological concentration of protein C (White et al., 2000), but its use in clinic at high doses has been associated to an excessive haemorrhagic risk (Martí-Carvajal et al., 2012). Therefore, as the cytoprotective and anti-inflammatory effects of the physiological coagulation inhibitors (AT and aPC) appears at much higher concentrations than their anticoagulant properties, their use in clinical situations is limited. The major interest of ZPI is that, in absence of PZ, it inhibits only FXIa, the inhibition of which does not cause spontaneous bleeding disorder (Al-Horani & Desai, 2016). Interestingly, the inhibition of FXIa generation was shown to improve the survival of mouse in a model of polymicrobial sepsis, and to minimize the inflammatory response as well as the coagulopathy (Tucker et al., 2012). Taken together, these preliminary data suggest that ZPI could constitute an adjuvant therapy in the treatment of sepsis, since, in contrast to the other natural anticoagulants hitherto tested, the high doses required to exhibit an anti-inflammatory activity are unlikely associated with a bleeding tendency.

Several reports suggested a link between the activation of the contact phase of the coagulation and inflammation. Activated factor XII (FXIIa) was recently shown to induce the production of pro-inflammatory cytokines by macrophages (Vorlova et al., 2017), and it was precedingly indicated that the inhibition of FXIa generation by the antibody 14E11 decreased circulating levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  (Tucker et al., 2012). Therefore, it could be speculated that the anti-inflammatory activity of high concentrations of ZPI could be due to the inhibition of FXIa. However, this seems unlikely, since the anti-inflammatory activity of rhZPI was conserved even in FXI deficient plasma and since the variant of ZPI (Y387A) which has lost its inhibitory activity towards FXIa has still an anti-inflammatory activity. It is to note that the variant (Y387A) was slightly less efficient than the wild-type rhZPI to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines by LPS-activated monocytes. Therefore, we cannot totally exclude a participation of the reactive loop centre of rhZPI to explain its anti-inflammatory

capacity, but most of the anti-inflammatory activity of rhZPI is independent of the active centre.

The mechanism of anti-inflammatory activity of ZPI is unclear. For AT and aPC, for example, it was shown that they inhibit the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B induced by LPS, and which is necessary to induce the secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  by monocytes (Oelschläger et al., 2002; White et al., 2000). The anti-inflammatory activity of these proteins was detected on purified monocytes. In contrast, we were unable to show an inhibitory activity of ZPI on purified monocytes stimulated by LPS as well as an impairment of NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus (data not shown). An inhibitory effect of ZPI was evidenced on PMBC stimulated by LPS, suggesting that a cooperation between both cellular types is mandatory for ZPI to exhibit an anti-inflammatory activity. Surprisingly, we observed that incubation of ZPI alone induced a rapid secretion of CCL-5 (RANTES). CCL-5 is stored in high quantity in platelets and can be released by platelet stimulation (Tormey & Stack, 2014), therefore we first eliminated the hypothesis, using washed platelets and flow cytometry analysis of platelet activation, that the increase of RANTES was due to a platelet activation by the rhZPI (data not shown). CCL-5 is mainly produced by lymphocytes (Conlon et al., 1995) and we can suspect that this secretion of CCL-5 is necessary to decrease the production pro-inflammatory cytokines by LPS-activated monocytes. Indeed, it was recently published that CCL-5 efficiently inhibits the release of IL-1 $\beta$  in response to stimulation of ATP receptor present on monocytes surface (Amati et al., 2017). In our whole blood model, we observed that recombinant CCL-5 decreased significantly the production of IL-6 and TNF- $\alpha$  (data not shown), giving consistence to a role of the increase of CCL-5 induced by ZPI and the concomitant decrease of IL-6 and TNF- $\alpha$ .

An interrelation between the PZ/ZPI complex and the inflammation pathways was previously suggested by the report of Butschkau et al (2013) indicating, that levels of IL-6 and IL-10 were substantially and significantly increased in PZ-deficient mice compared to their wild-type littermates, when they were submitted to a generalized Shwartzman reaction. They did not observe any consequences of ZPI deficiency on cytokines levels. These differences could be due to the fact, that, in mice, in contrast to humans, there is no free ZPI, since PZ is in excess in comparison to ZPI and all the ZPI is complexed to PZ. Furthermore, human and murine ZPI are quite different, since murine ZPI has a higher molecular mass than human ZPI (92 kDa *versus* 72 kDa), suggesting different glycosylations, which could modify the activity

of murine protein. In contrast, we were unable to show any capacity of PZ to modulate inflammation.

In conclusion, we have evidenced the capacity of human ZPI to down-regulate the inflammation both in vitro and in vivo. As previously observed with alpha-1 antitrypsin, another serpin positively regulated by inflammation, the mechanism(s) involved in its anti-inflammatory activity is not restricted to its active site but clearly deserve further investigations.

## References

Adam F, Verbeuren TJ, Fauchère J-L, Guillin M-C, Jandrot-Perrus M. (2003). Thrombin-induced platelet PAR4 activation: role of glycoprotein Ib and ADP. *J Thromb Haemost*;1:798-804.

Al-Horani RA, Desai UR (2016). Factor XIa inhibitors: A review of the patent literature. *Expert Opin Ther Pat*. 26:323-45

Al-Shanqeeti A, van Hylckama Vlieg A, Berntorp E, Rosendaal FR, Broze GJ Jr. (2005). Protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor. Determinants of levels and risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* ;93:411-3.

Amati AL, Zakrzewicz A, Siebers R, Wilker S, Heldmann S, Zakrzewicz D, Hecker A, McIntosh JM, Padberg W, Grau V (2017). Chemokines (CCL3, CCL4, and CCL5) Inhibit ATP-Induced Release of IL-1 $\beta$  by Monocytic Cells. *Mediators Inflamm.*;2017:1434872

Butschkau A, Nagel P, Grambow E, Zechner D, Broze GJ Jr, Vollmar B. (2013) Contribution of protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor in generalized Shwartzman reaction. *Crit Care Med.* ;41:e447-56.

Conlon K, Lloyd A, Chattopadhyay U, Lukacs N, Kunkel S, Schall T, Taub D, Morimoto C, Osborne J, Oppenheim J, Young H, Kelvin D, Ortaldo J. (1995) CD8<sup>+</sup> and CD45RA<sup>+</sup> human peripheral blood lymphocytes are potent sources of macrophage inflammatory protein 1 alpha, interleukin-8 and RANTES. *Eur J Immunol.*, 25:751-6.

Corral J, González-Conejero R, Hernández-Espinosa D, Vicente V. (2007) Protein Z/Z-dependent protease inhibitor (PZ/ZPI) anticoagulant system and thrombosis. *Br J Haematol.* 137:99-108.

Girard TJ, Lasky NM, Tuley EA, Broze GJ Jr. (2013) Protein Z, protein Z-dependent protease inhibitor (serpinA10), and the acute-phase response. *J Thromb Haemost.* 11:375-8.

Han X, Huang ZF, Fiehler R, Broze GJ Jr. (1999); The protein Z-dependent protease inhibitor is a serpin. *Biochemistry* ;38:11073-8.

Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr. (2000) Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. *Blood*, 96:3049-55

Hayakawa M, Kudo D, Saito S, Uchino S, Yamakawa K, Iizuka Y, Sanui M, Takimoto K, Mayumi T, Ono K, Azuhata T, Ito F, Yoshihiro S, Hayakawa K, Nakashima T, Ogura T, Noda E, Nakamura Y, Sekine R, Yoshikawa Y, Sekino M, Ueno K, Okuda Y, Watanabe M, Tampo A, Saito N, Kitai Y, Takahashi H, Kobayashi I, Kondo Y, Matsunaga W, Nachi S, Miike T, Takahashi H, Takauji S, Umakoshi K, Todaka T, Kodaira H, Andoh K, Kasai T, Iwashita Y, Arai H, Murata M, Yamane M, Shiga K, Hori N. (2016) Antithrombin Supplementation and Mortality in Sepsis-Induced Disseminated Intravascular Coagulation: A Multicenter Retrospective Observational Study. *Shock.* 46:623-631.

Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, Nagakari K, Suda M, Yoshikawa S, Ida Y (2005) Antithrombin ameliorates endotoxin-induced organ dysfunction more efficiently when combined with danaparoid sodium than with unfractionated heparin. *Intensive Care Med.*; 31:1101-8.

Janciauskiene S, Larsson S, Larsson P, Virtala R, Jansson L, Stevens T. (2004) Inhibition of lipopolysaccharide-mediated human monocyte activation, in vitro, by alpha1-antitrypsin. *Biochem Biophys Res Commun.* 321:592-600.

Kalsheker N, Morley S, Morgan K. (2002) Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. *Biochem Soc Trans.*;30:93-8.

Martí-Carvajal AJ, Solà I, Glud C, Lathyris D, Cardona AF. (2012) Human recombinant protein C for severe sepsis and septic shock in adult and paediatric patients. *Cochrane Database Syst Rev.*;12:CD004388.

Oelschläger C, Römisch J, Staubitz A, Stauss H, Leithäuser B, Tillmanns H, Hölschermann H. (2002) Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood.*;99:4015-20.

Richmond RJ, Zellner KM. (2005) Alpha1-antitrypsin deficiency: incidence and implications. *Dimens Crit Care Nurs.* 24:255-60.

Subramaniam D, Steele C, Köhnlein T, Welte T, Grip O, Matalon S, Janciauskiene S. (2010) Effects of alpha 1-antitrypsin on endotoxin-induced lung inflammation in vivo. *Inflamm Res,* 59:571-8.

Tabatabai A, Fiehler R, Broze GJ Jr. (2001) Protein Z circulates in plasma in a complex with protein Z-dependent protease inhibitor. *Thromb Haemost.* 85:655-60.

Tormey CA, Stack G (2014) Use of a cytokine-release assay to demonstrate loss of platelet secretory capacity during blood bank processing and storage. *Arch Pathol Lab Med.* ,138:1481-7

Tucker EI, Verbout NG, Leung PY, Hurst S, McCarty OJ, Gailani D, Gruber A. (2012) Inhibition of factor XI activation attenuates inflammation and coagulopathy while improving the survival of mouse polymicrobial sepsis. *Blood*, 119:4762-8.

Vorlova S, Koch M, Manthey HD, Cochain C, Busch M, Chaudhari SM, Stegner D, Yepes M, Lorenz K, Nolte MW, Nieswandt B, Zerneck A (2017). Coagulation factor XII induces pro-inflammatory cytokine responses in macrophages and promotes atherosclerosis in mice. *Thromb Haemost.*,117:176-187.

White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M, O'Neill L, Kelleher D, Schwarz HP, Smith OP. (2000) Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol.*;110:130-4.

Zhang J, Tu Y, Lu L, Lasky N, Broze GJ Jr. (2008) Protein Z-dependent protease inhibitor deficiency produces a more severe murine phenotype than protein Z deficiency. *Blood.* 111:4973-8

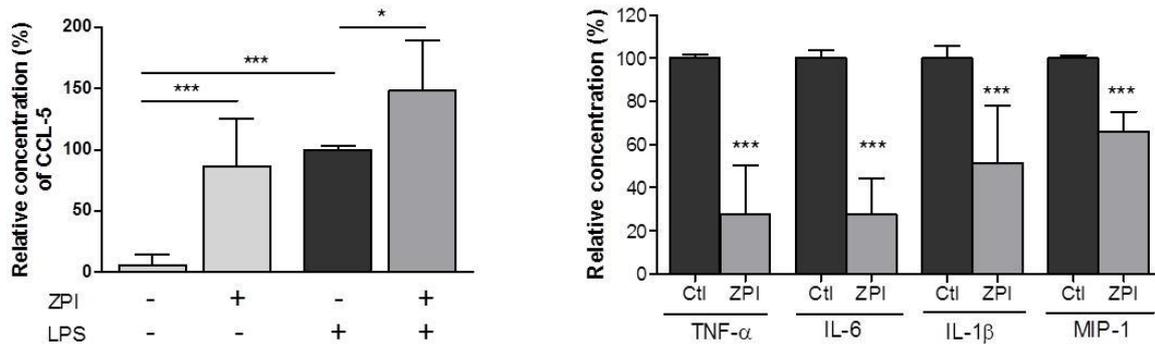


Fig 1: Variations of the production of different inflammatory mediators in whole blood incubated for 4 hours in the presence of PBS (controls), recombinant human ZPI (250 nM), LPS (10 ng/mL) or both LPS and ZPI.

rhZPI was added 30 min before the addition of LPS. Dots of the microarrays were integrated, according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as percentages of cytokines/chemokines induced by LPS which were considered arbitrarily as 100%. Results (mean  $\pm$  1 SEM) are the average of 3 independent experiments.

(A): variations of CCL-5 (RANTES), (B): inhibitory effects of ZPI on different cytokines/chemokines. The antibody used in the array recognize both CCL-3 and CCL-4 (Macrophage Inhibitory Protein-1 $\alpha$  and  $\beta$ ) \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to the production of cytokines in the presence of LPS alone

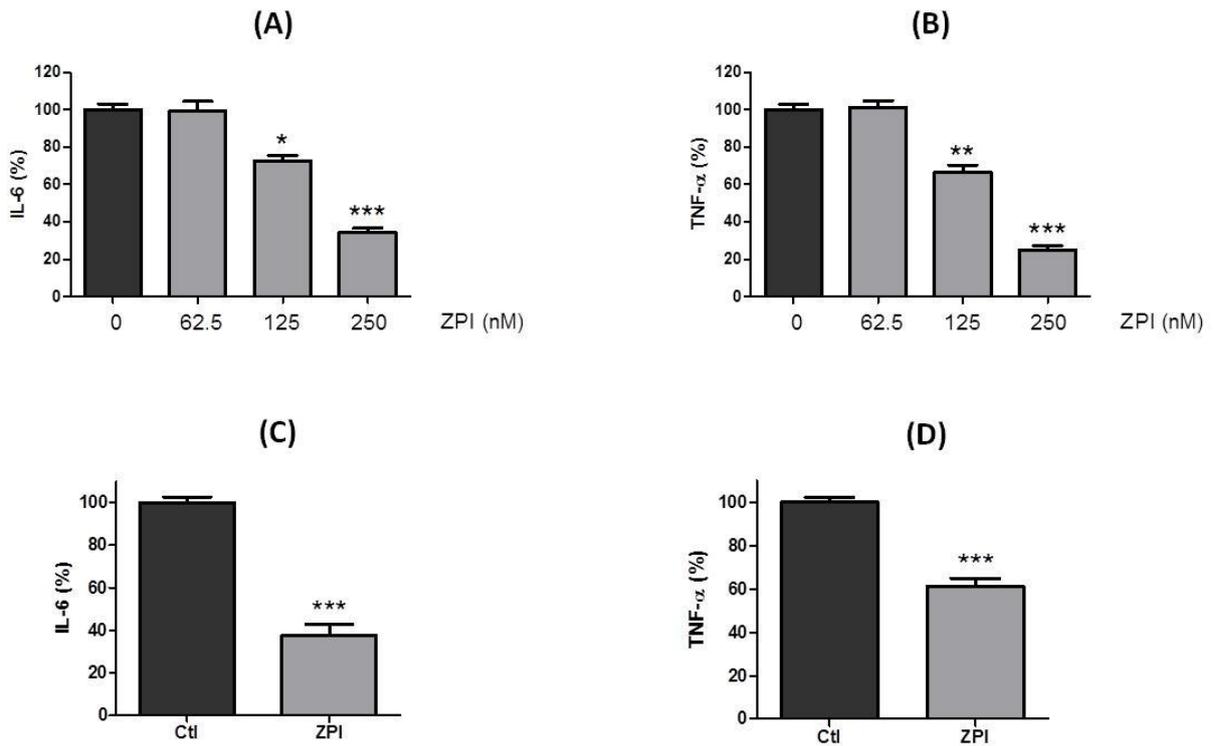


Fig 2: Effects of recombinant human ZPI (rhZPI) on the secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  in whole blood activated by lipopolysaccharide (LPS). Cytokines were quantified after 20 hours (A, B) or 4 hours (C, D) of incubation.

rhZPI was added 30 min before the addition of LPS (10 ng/mL). Results are expressed as percentages of IL-6 or TNF- $\alpha$  production in the absence of rhZPI (controls) which were considered arbitrarily as 100%. Results (mean  $\pm$  1 SEM) are the average of 3 (A, B) or 4 (C, D) independent experiments in triplicate. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to the production of cytokines in the presence of LPS alone

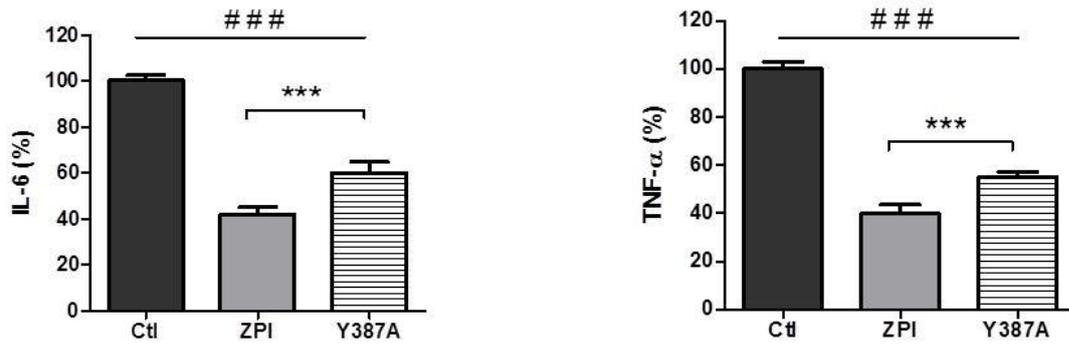


Fig 3: Effects of the rhZPI(Y387A) variant on the secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  in whole blood activated by lipopolysaccharide (LPS). Comparison with wild-type rhZPI. Cytokines were quantified after a 20 hours incubation.

rhZPI(Y387A) or rhZPI were added 30 min before the addition of LPS (10 ng/mL). Results are expressed as percentages of IL-6 or TNF- $\alpha$  production in the absence of ZPI (controls) which were considered arbitrarily as 100%. Results (mean  $\pm$  1 SEM) are the average of 3 independent experiments in triplicate. ###  $p < 0.001$  as compared to the production of cytokines in the presence of LPS alone, \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to the production of cytokines in the presence of wild-type ZPI.

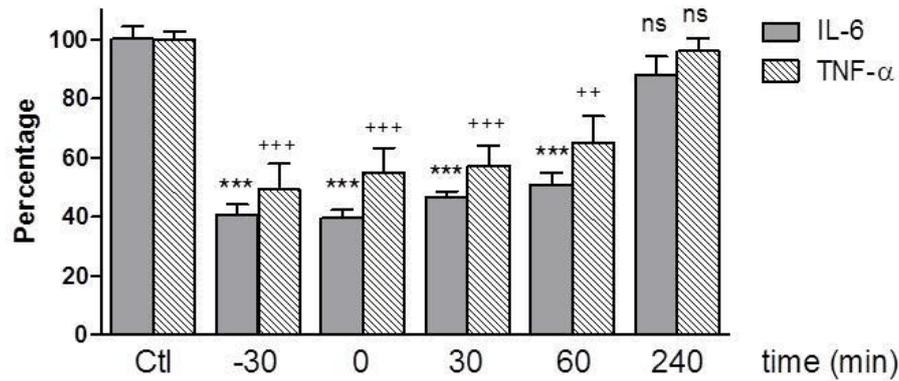


Fig 4: Inhibitory effects of 250 nM of recombinant human ZPI (rhZPI) according to when lipopolysaccharide (LPS) is added to the whole blood.

rhZPI was added 30 min before, simultaneously or 30, 60 and 240 min after the addition of LPS (10 ng/mL). Results are expressed as percentages of IL-6 or TNF- $\alpha$  production in the absence of rhZPI (controls) which were considered arbitrarily as 100%. Results (mean  $\pm$  1 SEM) are the average of 3 independent experiments in triplicate. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to the production of IL-6 in the presence of LPS alone. ++  $p < 0.01$ , +++  $p < 0.001$  as compared to the production of TNF- $\alpha$  in the presence of LPS alone.

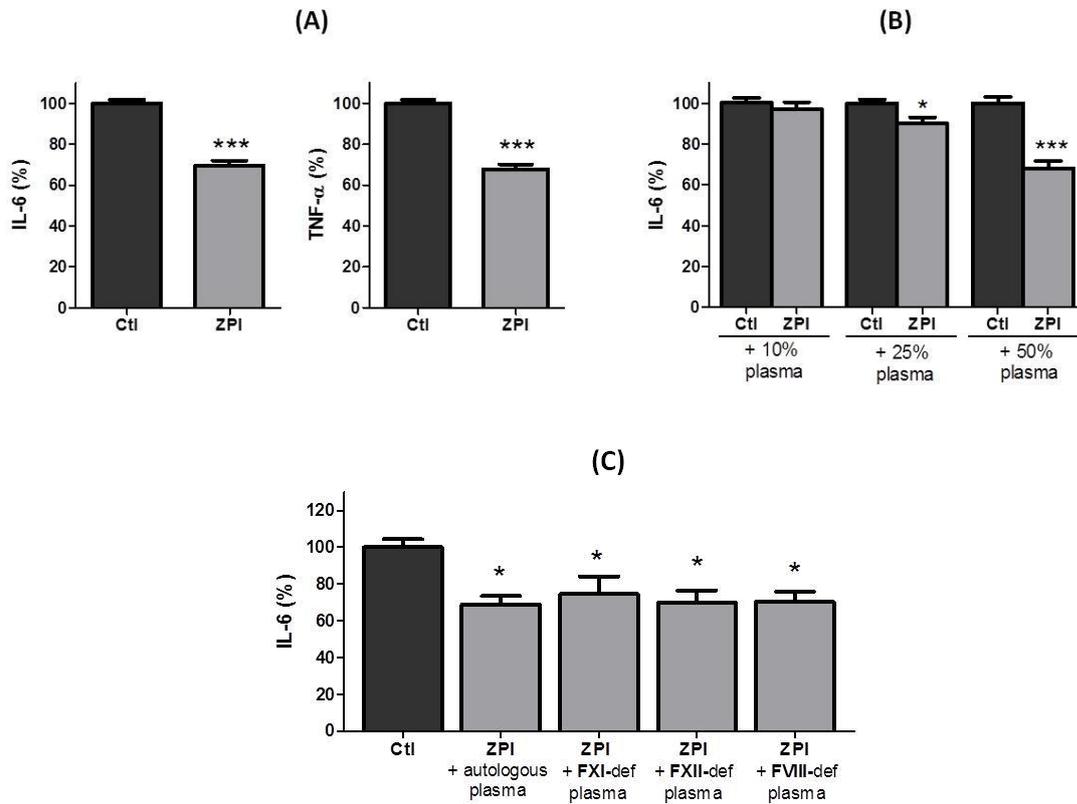


Fig 5: Effects of cellular cooperation and plasma on the inhibitory effects of recombinant human ZPI (250 nM) on isolated LPS-stimulated monocytes

rhZPI was added 30 min before the addition of 1 ng/mL of LPS (A) Effects of ZPI on peripheral blood mononuclear cells. (B) Variations of IL-6 production by LPS activated monocytes in the presence of ZPI (250 nM) and increasing concentrations of normal plasma. (C) Variations of IL-6 production by LPS activated monocytes in the presence of ZPI (250 nM) and increasing concentrations of plasmas deficient in coagulation factors. Results are expressed as percentages of cytokines induced by LPS which were considered arbitrarily as 100%. Results (mean  $\pm$  1 SEM) are the average of 3 independent experiments in triplicate.

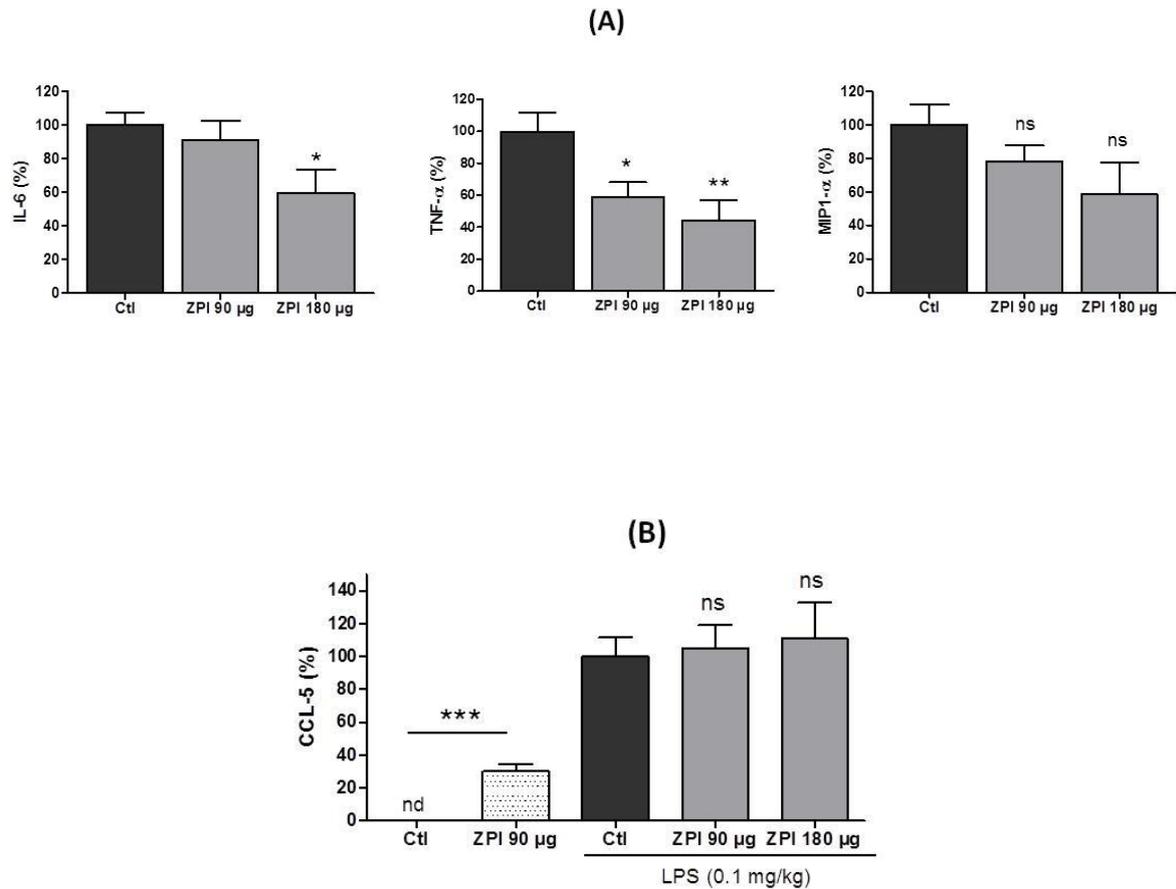


Fig 5: Effects of increasing doses of ZPI on the intraperitoneal injection of LPS to mice. (A): variations of plasma IL-6, TNF- $\alpha$  and MCP-1 levels, (B) variations of CCL-5 in peritoneal lavage.

rhZPI (90 or 180  $\mu$ g) was injected simultaneously with 0.1 mg/kg LPS in mice (intraperitoneal injection). Mice group control (n = 9), mice group ZPI 90  $\mu$ g (n = 8), mice group ZPI 180  $\mu$ g (n = 5) Plasma and peritoneal lavage were collected 2 hours after LPS administration. (A): variations of plasma IL-6, TNF- $\alpha$  and MCP-1 levels, (B) variations of CCL-5 in peritoneal lavage. Results are expressed as percentages of cytokines/chemokines induced by LPS injection in mice control which were considered arbitrarily as 100 %. Results (mean  $\pm$  1 SEM)

Table 1: Effects of purified Protein Z (PZ) on the inhibitory effects of recombinant human ZPI (rhZPI) on the secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated whole blood.

	IL-6 inhibition (%)				TNF- $\alpha$ inhibition (%)			
	PZ	ZPI	PZ/ZPI	<i>p</i> -value (ZPI vs PZ/ZPI)	PZ	ZPI	PZ/ZPI	<i>p</i> -value (ZPI vs PZ/ZPI)
62.5 nM	5.7 $\pm$ 0.9	0.5 $\pm$ 0.9	19.9 $\pm$ 3.9 <sup>oo</sup>	0.001	0.23 $\pm$ 9.0	1.2 $\pm$ 5.0	30.5 $\pm$ 2.3 <sup>oo</sup>	0.006
125 nM	17.4 $\pm$ 14.1	27.6 $\pm$ 3.9*	35.1 $\pm$ 2.2	0.240	11.6 $\pm$ 4.5	33.7 $\pm$ 4.5**	50.22 $\pm$ 9.7	0.185
250 nM	21.8 $\pm$ 6.0	65.8 $\pm$ 3.0***	71.6 $\pm$ 1.9	0.437	3.2 $\pm$ 7.8	75.1 $\pm$ 3.2***	82.2 $\pm$ 6.8	0.786

rhZPI and PZ were added 30 min before the addition of LPS (10 ng/mL). Results are expressed as percentages of inhibition of IL-6 or TNF- $\alpha$  production. Results (mean  $\pm$  1 SEM) are the average of 3 independent experiments in triplicate. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to the production of cytokines in the absence of ZPI. <sup>oo</sup>  $p < 0.01$  as compared to the effect of ZPI alone

## **Résultats supplémentaires**

Le ZPI diminue, de manière dose-dépendante, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induites par le LPS dans un modèle *in vitro* en sang total. Ces observations ont été confirmées *in vivo* dans un modèle d'endotoxémie par injection de LPS par voie intrapéritonéale chez la souris. En sang total, le variant ZPI (Y387A), qui n'a plus d'activité anticoagulante après l'induction d'une mutation au niveau de sa boucle réactive, possède encore des propriétés anti-inflammatoires. Donc, le ZPI possède un effet anti-inflammatoire indépendant de son activité anticoagulante. Ces propriétés confèrent au ZPI un intérêt potentiel dans le traitement du choc septique. De plus, le ZPI inhibe le FXIa de la coagulation, dont l'inhibition a été montrée comme pouvant améliorer la survie dans des modèles de souris en choc septique. Dans l'article que j'ai présenté, nous avons utilisé l'injection intra-péritonéale de rhZPI. Toutefois ce modèle a une limitation certaine, car le ZPI humain a des caractéristiques différentes du ZPI murin (masse moléculaire de 92 kDa du ZPI murin *versus* 72 kDa pour le ZPI humain, vraisemblablement en fonction de glycosylations différentes). De plus, l'injection de LPS ne permet pas de reproduire les différentes étapes du sepsis. Le modèle ligature et ponction caecale (LPC) semble être un modèle plus relevant (272).

Pour établir le modèle *in vivo* présenté précédemment, nous avons donc recherché la durée de vie du rhZPI injecté à la souris.

Deuxièmement, comme les protéines recombinantes peuvent avoir des glycosylations différentes de la protéine endogène nous avons envisagé d'induire chez la souris du ZPI par injection hydrodynamique.

J'ai commencé par mettre au point la technique en déterminant la dose de plasmide à injecter et l'intervalle de temps nécessaire pour avoir la concentration maximale de ZPI dans le plasma des souris. Par la suite, la LPC a été réalisée chez la souris le jour correspondant à l'atteinte du pic du taux plasmatique de ZPI. La survie des souris entre le groupe traité et le groupe contrôle a été comparée pour apprécier l'effet protecteur d'un taux plasmatique élevé de ZPI.

## Matériels et méthodes

### Production des plasmides pour l'injection hydrodynamique (IH)

L'ADN codant pour le ZPI murin (273) a été inséré dans le vecteur pLive entre les sites NheI et XhoI (Eurogentec, Belgique). La transformation bactérienne a été réalisée avec le kit One Shot TOP10 (ThermoFisher), permettant l'amplification des plasmides pLive-ZPI<sub>m</sub> et le contrôle pLive vide. Après leur extraction, les plasmides sont vérifiés par digestion enzymatique avec NheI et XhoI suivie d'une migration sur un gel d'agarose 1%.

### Souris

Les souris utilisées étaient des C57BL/6 femelles d'environ 20 g et fournies par Envigo (Gannat, France).

La demi-vie du rhZPI a été évalué par l'injection par le sinus rétro-orbitaire de 90 µg rhZPI (n = 3 souris), soit un taux plasmatique qui serait à 45 µg/mL en supposant que la souris a 2 mL de sang circulant. Puis des prélèvements rétro-orbitaires avaient été effectués 5 min, 1 h, 4h, 6h et 24 h après l'injection. Le plasma est récupéré après centrifugation du sang (20 min, 1500 g) puis conservé à -20°C pour le dosage du ZPI.

Pour l'analyse de la cinétique de production du ZPI<sub>m</sub> après IH, les souris avaient été divisées en 2 groupes (5 souris/groupe): un groupe recevant le vecteur pLive vide (contrôle) et un groupe recevant pLive-ZPI<sub>m</sub>. Une injection de 100 µg de plasmides (dilué dans du sérum physiologique) par souris était réalisée.

### La ligature et ponction caecale (LPC)

La ligature et ponction caecale a été réalisée 4 jours après l'IH, 4 groupes de souris ont été constitués :

- Groupe 1 : IH pLive et « Sham » (n = 5)
- Groupe 2 : IH pLive et LPC (n = 5)
- Groupe 3 : IH pLive-ZPI<sub>m</sub> et « Sham » (n = 5)
- Groupe 4 : IH pLive-ZPI<sub>m</sub> et LPC (n = 5)

Le protocole pour la LPC suit les recommandations de Rittirsch et coll. (274). Brièvement, les souris anesthésiées (injection intrapéritonéale de buprénorphine 0,05 mg/kg puis isoflurane) étaient rasées et désinfectées à la bétadine au niveau de l'abdomen, puis une laparotomie médiane de 1,5-2 cm a été réalisée. Le caecum était par la suite exposé, ligaturé à sa base,

puis perforé à l'aide d'une aiguille 21 G pour extérioriser de la matière fécale. Ensuite, le caecum était remis dans la cavité abdominale suivi d'une suture abdominale. Les souris avaient reçu une injection sous-cutanée de NaCl 0,9 % (3 mL/100 g) avant leur réveil, puis remises en cage individuellement.

La sévérité du modèle dépend de la longueur du caecum ligaturé, plus la surface ligaturée est longue, plus le modèle sera sévère. Nous avons choisi un modèle sévère avec au moins 75 % de caecum ligaturé.

La même procédure chirurgicale était effectuée aux souris du groupe contrôle appelé « Sham », à l'exception de la ligature et de la perforation caecale.

Un prélèvement retro-orbital avait été réalisé avant et un jour après l'opération pour les 4 groupes de souris, des prélèvements supplémentaires après 7 et 10 jours de l'IH avaient été effectués pour les souris contrôles. Une numération sanguine est réalisée avec le sang prélevé sur EDTA (8 µL d'EDTA 0,5 M pour 4 gouttes de sang) et le plasma est obtenu après une double centrifugation (2000 g, 10 min) du sang puis conservé à -20°C pour le dosage du ZPI murin.

Pour déterminer la courbe de survie dans les deux groupes LPC, les souris étaient surveillées toutes les heures dans la journée et toutes les 5 heures pendant la nuit. Une injection intrapéritonéale de buprénorphine était réalisée toutes les 12 heures.

#### ELISA pour le dosage du ZPI humain

C'est un « ELISA sandwich » dont le protocole a été développé dans notre laboratoire. L'anticorps de capture est un anticorps de mouton anti-ZPI (ABIN 572295, Molecular Innovations, USA), utilisé à 5 µg/mL dans un tampon contenant 50 mM de carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ), pH 9,6. Cent µL sont déposés dans les puits d'une microplaque à 96 puits (Maxisorp, ThermoScientific). Après avoir laissé la plaque pendant une nuit à 4°C, les 100 µL sont éliminés par retournement et les puits sont lavés 3 fois avec une solution de PBS additionné de 0,1 % de Tween (PBS-T). Les puits sont ensuite saturés à température ambiante pendant au moins 1 h avec du tampon PBS contenant 5 % de BSA et 0,1 % de Tween 20. Les échantillons à doser sont déposés (50 µL/puits) et mis à incuber pendant 2 h, puis après 3 lavages au PBS-T, 50 µL d'anticorps de révélation (anticorps anti-ZPI de mouton couplé directement à la peroxydase) (ABIN 572298, Molecular Innovations, USA), à la concentration de 5 µg/mL dans du PBS additionné de 1 % de BSA et 0,1 % de tween 20, sont déposés. Les puits sont lavés 3 fois avec du PBS-T et le substrat de la peroxydase (tétraméthylbenzidine, TMB, Interchim, Montluçon France) est ajouté (50 µL/puits). Après 5

min de révélation, la réaction est arrêtée avec une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2 M, et l'absorbance est lue à 450 nm sur un spectrophotomètre.

La gamme d'étalonnage est réalisée avec un pool de plasma humain (30 personnes), contenant une concentration théorique de 4 mg/L de ZPI.

#### Western-blots

- Pour l'analyse de la demi-vie du ZPI recombinant humain (rhZPI) chez la souris, une quantité de 10 ng a été déposée comme contrôle et les plasmas de souris sont dilués à 1/20 (20 µL/dépôts).
- Pour le dosage du ZPI murin, une gamme de pool de plasma de souris (dilutions : 1/10, 1/20, 1/40 et 1/80) et les plasmas des souris contenant le ZPI à doser (dilution 1/40) sont déposés en gel pour la migration (20 µL/dépôts).

La migration des échantillons se fait sur un gel 4-12 % de polyacrylamide NuPAGE® Bis-Tris, 1 mm d'épaisseur, 15 puits (ThermoFisher Scientific). Les échantillons sont dilués dans du tampon Laemmli (62,5 mM de Tris-HCl à pH 6,8, 2 % de SDS, 10 % de glycérol, 0,004 % de bleu de bromophénol, et 5 % de β-mercaptoéthanol), puis dénaturés à 100°C pendant 5 min. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le « *Prestained Protein Ladder* » (Euromedex, France). La migration est effectuée à 100 Volt pendant 10 min, puis à 220 V pendant 50 min, dans un tampon NuPAGE MOPS (ThermoFisher Scientific). Les protéines sur le gel sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Protran™ 0,45 µm, GE Healthcare). La membrane est par la suite saturée avec 5% de BSA diluée dans du *Tris-Buffered saline* (TBS) pendant au moins 1 heure. Ensuite, l'anticorps primaire est dilué dans du PBS avec 1% de BSA et incubé toute la nuit à 4°C. La membrane est ensuite lavée trois fois pendant 10 min avec du TBS contenant 0,1 % de Tween20, et incubée pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire dans du TBS. La chimioluminescence est ensuite analysée par ajout du substrat *enhanced chemiluminescence* (ECL) (Pierce™ ECL, ThermoFisher Scientific).

- *Western-blot anti-ZPI humain* : l'anticorps primaire est ajouté à la concentration de 0,6 µg/mL (ref: ABIN572295, Antibodies.online.com) et l'anticorps secondaire est un anticorps anti-mouton couplé à la peroxydase (Jackson IR, Angleterre), dilué à 1/20000.

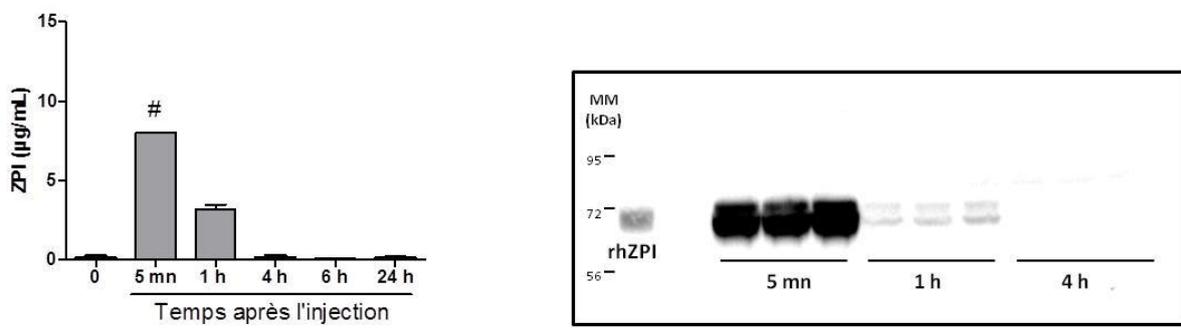
- Western-blot anti-ZPI murin : l'anticorps primaire est ajouté à la concentration de 0,3 µg/mL (ref: ABIN2000749, Antibodies.online.com) et l'anticorps secondaire est un anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase (Abcam), dilué à 1/20000.

L'intensité de la bande correspondant au ZPI<sub>m</sub> obtenue en western-blot était quantifiée par le logiciel Image J, puis normalisée par rapport à celle de l'albumine pour chaque souris. La concentration du ZPI<sub>m</sub> dans l'échantillon était déduite en intégrant son intensité de bande dans celle obtenue avec la gamme de pool de plasma murin.

## Résultats

### Le rhZPI a une demi-vie très courte après une injection intraveineuse chez la souris

Une administration par voie intra-péritonéale du rhZPI diminue la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires induites par une injection de LPS chez la souris. Afin de confirmer l'effet protecteur du ZPI dans un modèle de choc septique, nous avons commencé par évaluer la demi-vie du rhZPI pour une éventuelle administration systémique. Le rhZPI (90 µg) a été administré par le sinus retro-orbitaire, et sachant qu'un taux plasmatique aux environs de 45 µg/mL était attendue après l'administration, 3,5 µg/mL est dosé dans le plasma 1 heure après l'injection (figure 1).

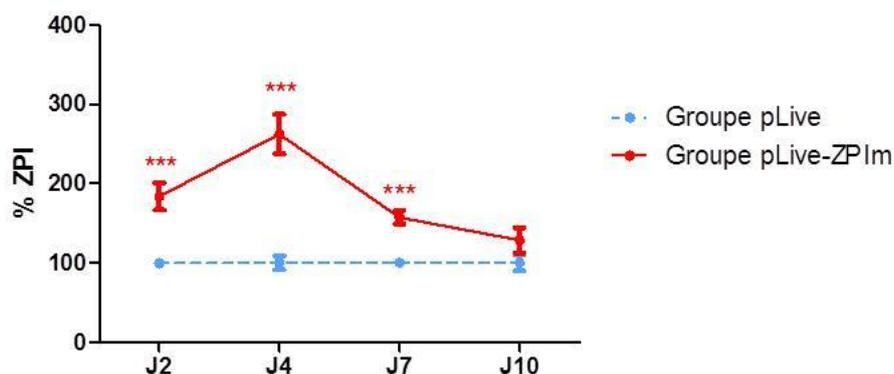


### **Figure 1 : Elimination du rhZPI après une administration par le sinus retro-orbitaire chez la souris.**

*Dosage du rhZPI à différents temps après l'injection retro-orbitaire (A) par ELISA. # le taux plasmatique est > 10 µg/mL (B) en western-blot. Le ZPI a été identifié par l'anticorps (ref: ABIN572295, Antibodies.online.com) qui ne reconnaît que le ZPI humain.*

### L'injection hydrodynamique (IH) permet d'augmenter le taux plasmatique de ZPI chez la souris.

L'IH consiste à l'injection rapide d'un volume important d'ADN codant pour le ZPI murin (ZPI<sub>m</sub>) au niveau de la veine caudale des souris. Nous avons commencé par vérifier si le taux plasmatique de ZPI<sub>m</sub> peut être augmenté par cette technique, puis déterminé la cinétique de production du ZPI murin dans le plasma des souris après l'IH. Une augmentation significative du taux plasmatique du ZPI<sub>m</sub> est observée 2 jours après l'IH (J2) ( $184 \pm 17 \%$ ,  $p < 0,001$ ), avec un pic de concentration atteint à (J4) ( $259 \pm 36 \%$ ,  $p < 0,001$ ) et une diminution progressive jusqu'à (J10) ( $128 \pm 15 \%$ ). Toutefois, l'augmentation reste encore significative à J7 ( $157 \pm 8 \%$ ) (Figure 2)



**Figure 2 : Cinétique de l'augmentation du taux plasmatique de ZPI après l'injection hydrodynamique chez la souris.**

*Représentation du taux plasmatique de ZPIIm après l'injection hydrodynamique (IH), les souris ont été prélevées à différents jours après l'IH (J2 à J10), 5 souris par groupe ont été observées. \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au taux de ZPIIm dans le contrôle (groupe pLive).*

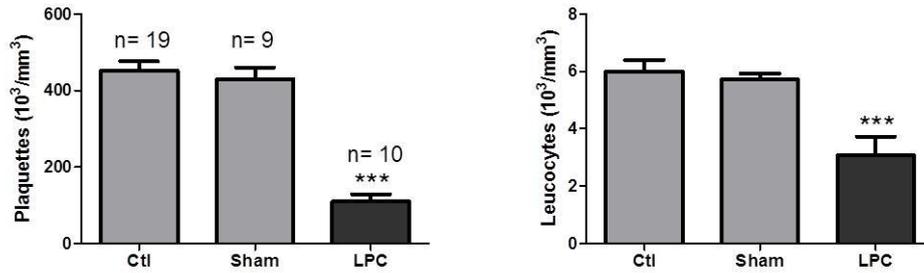
#### Réalisation de l'IH suivie de la ligature et ponction caecale (LPC)

Afin d'analyser l'effet protecteur d'un taux élevé du ZPI dans le plasma au cours du choc septique, nous avons décidé de réaliser le modèle de choc septique (LPC) 4 jours après l'IH.

Après la LPC, les souris opérées présentaient des signes comportementaux de choc (déplacement limité et asthénie), et une numération sanguine caractérisée par une leucopénie et une thrombopénie (figure 3).

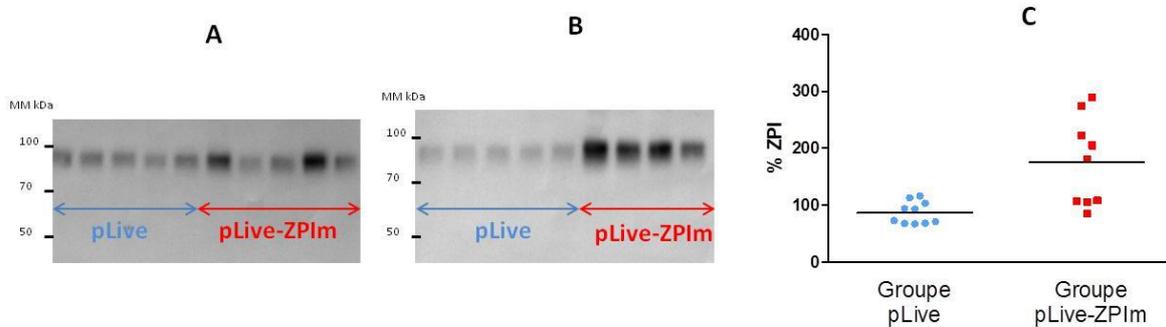
Une vérification de l'augmentation du taux plasmatique du ZPIIm a été réalisée (figure 4), et malgré une moyenne plus élevée du taux de ZPIIm dans le groupe pLive-ZPIIm, 3 souris n'ont pas eu l'augmentation souhaitée, deux dans le groupe LPC et une dans le groupe « Sham » (figure 4).

Les 2 souris qui ne présentaient pas une augmentation de leur taux plasmatique de ZPI ont été exclues dans la représentation de la courbe de mortalité. Les deux groupes de souris (pLive LPC) et (pLive-ZPIIm LPC) n'avaient pas une différence significative concernant leur survie après le choc septique (figure 5).



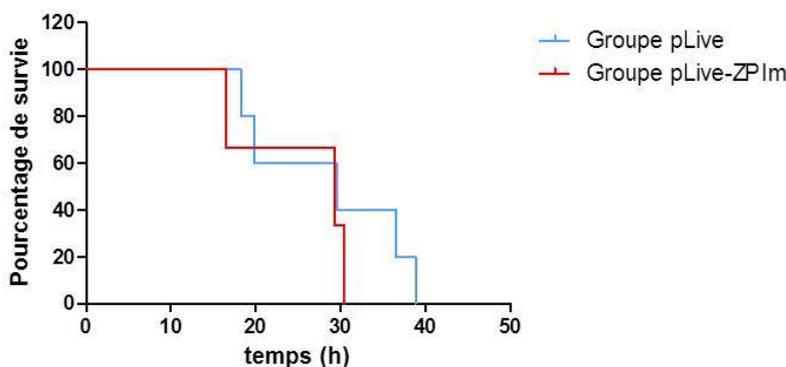
**Figure 3 : Taux des plaquettes et des leucocytes chez les souris après la LPC.**

Les souris ont été prélevés (rétro-orbitaire) avant et après la LPC (ou Sham). Les valeurs des taux plaquettaires et leucocytaires avant la chirurgie représentent la valeur des contrôles (Ctl), puis les souris ont été séparées en deux groupes : groupe Sham et groupe LPC. \*\*\* $p < 0,001$  par rapport aux souris du groupe Sham.



**Figure 4 : Augmentation du taux plasmatique du ZPI chez les souris après l'injection hydrodynamique.**

(A et B) western-blot réalisé avec les plasmas des souris du groupe pLive ou pLive-ZPIIm 4 jours après l'injection hydrodynamique. (C) représentation de l'augmentation après quantification de l'intensité de bandes en western-blot.

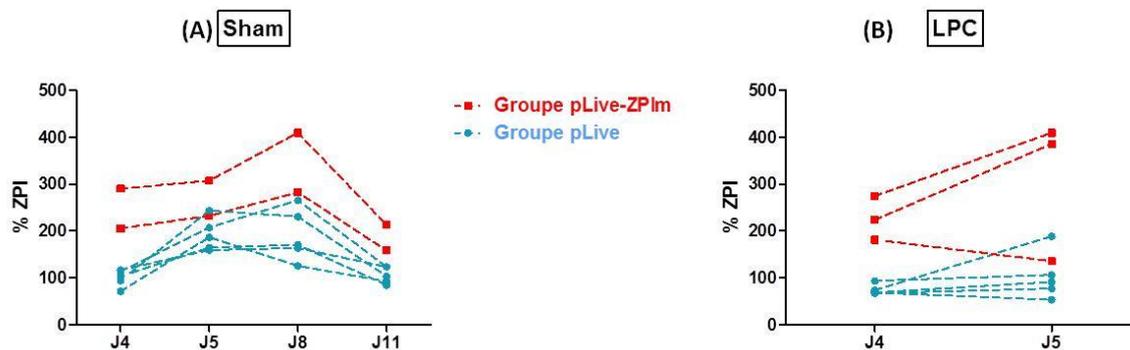


**Figure 5 : Courbe de mortalité des deux groupes de souris (pLive) ou (pLive-ZPIIm) après la LPC.**

Groupe pLive,  $n = 5$  et groupe pLive-ZPIIm,  $n = 3$

### Augmentation du taux plasmatique du ZPI suite à la chirurgie

Le ZPI est une protéine de l'inflammation, il a été montré que son taux plasmatique augmente notamment après une ovariectomie chez la femme (1). Le taux de ZPI dans les plasmas des 4 groupes de souris ont été dosés. Dans les deux groupes Sham (pLive et pLive-ZPI) : une augmentation du taux plasmatique de ZPI a été observée que ce soit chez les souris du groupe pLive-ZPI, dont le taux était déjà élevé suite à l'IH, ou dans le groupe pLive. Dans les deux groupes qui ont eu la LPC, les résultats sont hétérogènes, une augmentation est remarquée seulement chez une souris du groupe pLive et chez 2 souris du groupe pLive-ZPI (figure 6).



**Figure 6 : Taux plasmatique du ZPI chez les souris ayant eu ou non la LPC.**

*Dosage du ZPI dans les plasmas de souris à différents jours après l'IH. Chaque point représente une souris. (A) Groupe Sham, divisé en deux sous groupes : pLive vide en bleu et pLive-ZPI en rouge. (B) groupe LPC, divisé en deux sous groupes : pLive vide en bleu et pLive-ZPI en rouge.*

## Discussion et conclusion

Le rhZPI est éliminé rapidement suite à une administration systémique (rétro-orbitaire) chez la souris, en absence de toute stimulation externe. Moins de 10 % de la quantité administrée est retrouvée dans le plasma des souris 1 heure après l'injection. L'alignement de séquence des acides aminés composants les deux protéines, ZPI humain et murin, ont pourtant près de 70 % d'homologie mais cette dégradation rapide de la circulation sanguine chez la souris marque la barrière de l'espèce.

De ce fait, l'injection hydrodynamique (IH) a été utilisée pour augmenter la concentration plasmatique du ZPI chez la souris. C'est une technique qui consiste à une injection rapide (< 7 secondes) d'un volume de plasmides représentant 10 % du poids de la souris au niveau de la veine caudale. Les plasmides injectés vont passer par la veine cave et transfecter les cellules hépatique et permettre la production de la protéine dont l'ADN codant était contenu dans le plasmide (275). Cette technique est souvent utilisée dans notre laboratoire, par exemple pour l'augmentation du taux de von Willebrand chez la souris (276). L'injection hydrodynamique a permis d'augmenter le taux plasmatique du ZPI à environ 2,5 fois chez les souris traités par rapport aux souris contrôles. Le pic d'augmentation est obtenu après 4 jours de l'IH et diminue progressivement, nous avons décidé d'attendre ces 4 jours pour laisser le temps aux souris de retrouver une numération sanguine normale après l'IH.

Le modèle de choc septique réalisée chez la souris a été la ligature et ponction caecale (LPC). C'est un modèle décrit comme permettant en utilisant la souris ou le rat de se rapprocher de la physiopathologie du choc septique chez l'homme (272). La survie des souris entre le groupe traité et le groupe contrôle a été comparée pour apprécier l'effet protecteur d'un taux plasmatique élevé de ZPI chez la souris, aucune différence significative n'est observée entre la survie du groupe traité par rapport au contrôle. Cependant, l'effet anti-inflammatoire du ZPI que nous avons observé en sang total nécessite au moins 4 ou 5 fois la concentration physiologique du ZPI, donc il est possible que l'augmentation du taux de ZPI induite par l'IH ne soit pas suffisante. De plus, le nombre de souris dans les deux groupes comparés sont faibles.

Le taux plasmatique du ZPI augmente chez les souris après une simple chirurgie, en effet dans le groupe Sham, où il n'y a pas eu l'induction de la péritonite, une augmentation du taux de ZPI est observée sûrement en réponse à l'inflammation, le ZPI étant une protéine de

l'inflammation (79). Dans le groupe LPC, l'augmentation n'est pas retrouvée chez toutes les souris, voire une diminution sur une des souris. Comme au cours du choc septique, il y a en même temps une inflammation et une activation de la coagulation, la diminution du ZPI peut être due à une consommation.

Pour conclure, l'augmentation du taux plasmatique de ZPI induite par l'IH n'est peut-être pas suffisante pour que le ZPI puisse avoir un effet sur la survie des souris en choc septique, une injection de ZPI recombinant murin pourrait être envisagée, ceci permettrait d'administrer une quantité plus importante de ZPI murin.



## 2<sup>ème</sup> partie : Etude de l'impact des NETs sur l'activité anticoagulante du ZPI

### Introduction

L'inflammation et la coagulation sont deux mécanismes physiologiques étroitement liés. Au cours d'une inflammation aiguë, la dégranulation des polynucléaires neutrophiles suite à leur activation va entraîner la libération, entre autres, des médiateurs toxiques et des protéases comme l'élastase neutrophile (EN), la cathepsine G ou la myéloperoxydase. Ces protéases sont capables de cliver les inhibiteurs physiologiques de la coagulation, comme l'antithrombine (277), le TFPI (158,278) et la protéine S (279), favorisant ainsi la coagulation et la formation d'un réseau de fibrine. Plus récemment, la production de *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), appelée NETose, par les polynucléaires neutrophiles activés a été mis en évidence. La NETose est une forme de défense par laquelle les polynucléaires neutrophiles libèrent un réseau de fibres de chromatines, composés d'ADN et d'histones, décoré de protéines granulaires des neutrophiles dont l'EN et la cathepsine G. Les NETs ont pour fonction première de piéger les microorganismes pathogènes dans un environnement riche en enzymes bactéricides, pour éviter leur dissémination. Massberg et coll. ont montré que les NETs sont capables d'induire une thrombose locale, notamment par clivage des inhibiteurs physiologiques de la coagulation comme le TFPI *via* les protéases à leur surface (158).

Le ZPI est un anticoagulant physiologique isolé en 1998 et dont la relevance physiologique a été mise en évidence chez les souris déficitaires en ZPI par l'observation d'une mortalité plus importante par rapport aux souris « sauvages » dans des modèles de thromboses. Nous nous sommes donc intéressés aux interactions ZPI/NETs, notamment en ce qui concerne son activité anticoagulante.

## Matériels et méthodes

Le FXIa est une protéine purifiée fournie par Enzyme Research Laboratories (Stago BNL, Pays-Bas), et le FXa distribué par Stago (France).

L'élastase Neutrophile (EN) de leucocytes humains provient de chez Sigma-Aldrich (ref. E8140).

L'alpha1-antitrypsine (AAT) était de chez Sigma-Aldrich.

La DNase I est une enzyme fournie par New England Biolabs (France)

### Isolement des polynucléaires neutrophiles et NETose

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont isolés à partir de sang par élimination des globules rouges suivi d'une centrifugation en utilisant du Ficoll-Plaqué™ PLUS. Le culot de PNN est resuspendu dans du *Hank's Balanced Salt Solution* HBSS (Dominique Dutscher, France) supplémenté par 0,5 % de sérum de veau fœtal ou SVF (Gibco - ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) à une concentration de  $4.10^6$  cellules/mL après comptage sur une cellule de Malassez. Les PNN sont mis en culture à une concentration de  $2,6.10^6$  cellules/mL dans une plaque de culture 48 puits (ThermoScientific) ou  $1,3.10^5$  cellules/mL dans des chambres de culture à 8 compartiments (Lab-Tek I™ en plastique Permax, ThermoScientific) et la NETose est induite par incubation à 37°C des PNN pendant au moins 3 heures avec du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Calbiochem, Merck-Millipore, France) à une concentration finale de 50 nM dilué dans du HBSS.

### Incubation du ZPI sur les NETs

Après induction de la NETose, le surnageant cellulaire est éliminé par aspiration et remplacé par 90 µL de HBSS contenant le rhZPI (50 µg/mL) en présence ou en absence de PZ (50 µg/mL) et en présence ou non d'AAT (250 µg/mL). Après une incubation pendant 1h, 2h, ou 17h à 37°C, le surnageant contenant le rhZPI incubé sur les NETs a été collecté, centrifugé à 16 000 g pendant 10 min pour éliminer tout débris cellulaire, puis le surnageant a été conservé à -20°C pour les analyses qualitatives suivantes. Après avoir collecté le surnageant contenant le rhZPI incubé sur les NETs, ceux-ci ont été dégradés par un traitement à la DNase (à 20 U/mL dans du HBSS sous un volume de 90 µL) pendant 20 min à 37°C. Ce milieu contenant les NETs dégradés a ensuite été collecté, centrifugé à 16 000 g pendant 10 min pour éliminer tout débris cellulaire, puis le surnageant a été conservé à -20°C pour les analyse qualitatives suivantes.

## Immunofluorescence

Après incubation avec le rhZPI, en présence ou en absence de PZ sur les NETs, les cellules sont fixées par 100 µL de paraformaldéhyde PFA (4 %) pendant 20 min. Ensuite, le PFA est éliminé par deux lavages avec du PBS, et le Lab Tek™ est incubé à 4°C toute la nuit en présence de 1% BSA (150 µL/puits). Ensuite, l'anticorps anti-ZPI (ref : ABIN572295, Antibodies.online.com) à la concentration de 10 µg/mL (150 µL/puits) est ajouté. Après 1 heure d'incubation, après 3 lavages, l'anticorps secondaire (2 µg/mL) anti-mouton fluorescent (Alexa 594, Invitrogen ThermoFisher) est incubé pendant 1 heure. Enfin, la lame est séchée et le liquide de montage (Southern Biotech, USA) contenant du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) est ajouté pour observer les filaments d'ADN qui apparaissent en bleu lors de l'observation au microscope à 350 nm.

## Electrophorèse en gel de polyacrylamide et dodecylsulfate de sodium (SDS-PAGE)

La migration des milieux réactionnels se fait sur un gel 4-12 % de polyacrylamide NuPAGE® Bis-Tris, 1 mm d'épaisseur (ThermoFisher Scientific). Les échantillons sont dilués dans du tampon Laemmli (62,5 mM de Tris-HCl à pH 6,8, 2 % de SDS, 10 % de glycérol, 0,004 % de bleu de bromophénol, et 5 % de β-mercaptoéthanol), puis dénaturés à 100°C pendant 5 min. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le « *Prestained Protein Ladder* » (Euromedex, France). La migration est effectuée à 100 Volt pendant 10 min, puis à 220 V pendant 50 min, dans un tampon NuPAGE MOPS (ThermoFisher Scientific). Après migration, le gel est coloré avec de l'InstantBlue™ (Expedeon, USA).

Pour la mise en évidence des produits de clivage de faible poids moléculaire (< 10 kDa), la migration des milieux réactionnels se fait sur un gel Novex™ 10-20% *Tricine Protein Gels*, 1 mm d'épaisseur, 10 puits. Les échantillons sont dilués dans du tampon *Tricine SDS Sample Buffer* puis dénaturés à 100°C pendant 5 min. La migration se fait à 100 V pendant 2 h dans un tampon *Tricine SDS Running Buffer*. La coloration est réalisée en nitrate d'argent avec le kit SilverQuest™ (ThermoFisher Scientific) pour améliorer la sensibilité.

## Western-Blot

Après migration sur gel, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Protran™ 0,45 µm, GE Healthcare). La membrane est par la suite saturée avec 5% de BSA diluée dans du *Tris-Buffered saline* (TBS) pendant au moins 1 heure. Ensuite, l'anticorps anti-ZPI est ajouté à la concentration de 0,6 µg/mL (ref: ABIN572295,

Antibodies.online.com) dilué dans du PBS avec 1% de BSA et incubé toute la nuit à 4°C. La membrane est ensuite lavée trois fois pendant 10 min avec du TBS contenant 0,1 % de Tween20, et incubée pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps anti-mouton couplé à la peroxydase (Jackson IR, Angleterre), dilué à 1/20000 dans du TBS. La chimioluminescence est ensuite analysée par ajout du substrat *enhanced chemiluminescence* (ECL) (Pierce<sup>TM</sup> ECL, ThermoFisher Scientific).

#### Activité anti-FXIa du ZPI

La réaction enzymatique a été réalisée dans un tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), avec 0,1% de polyéthylène glycol (PEG-8000) et 0,1 % BSA. Le ZPI (4,2 µM) est incubé avec le substrat chromogénique CS2166 (1 mM, BIOPHEN<sup>TM</sup>, Hyphen France) sous un volume de 20 µL. Les réactions concomitantes d'hydrolyse du substrat catalysée par le FXIa et d'inhibition du FXIa par le ZPI sont déclenchées par l'ajout de 80 µL de FXIa (500 pM) au mélange ZPI-Substrat.

#### Activité anti-FXa du ZPI

La réaction enzymatique est réalisée dans un tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), avec 0,1% de polyéthylène glycol (PEG-8000), 0,1 % BSA, et 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. Le ZPI (100 nM) est incubé avec le substrat chromogénique CS1165 (2 mM, BIOPHEN<sup>TM</sup>, Hyphen France) en présence de PZ purifiée (100 nM) et de phospholipides (50 µM, 60 % phosphatidylcholine, 20 % phosphatidylserine et 20 % phosphatidylethanolamine) sous un volume de 50 µL. Les réactions concomitantes d'hydrolyse du substrat catalysée par le FXa et d'inhibition du FXa par le ZPI sont déclenchées par l'ajout de 50 µL de FXa (5 nM) au mélange ZPI-PZ-PL-Substrat.

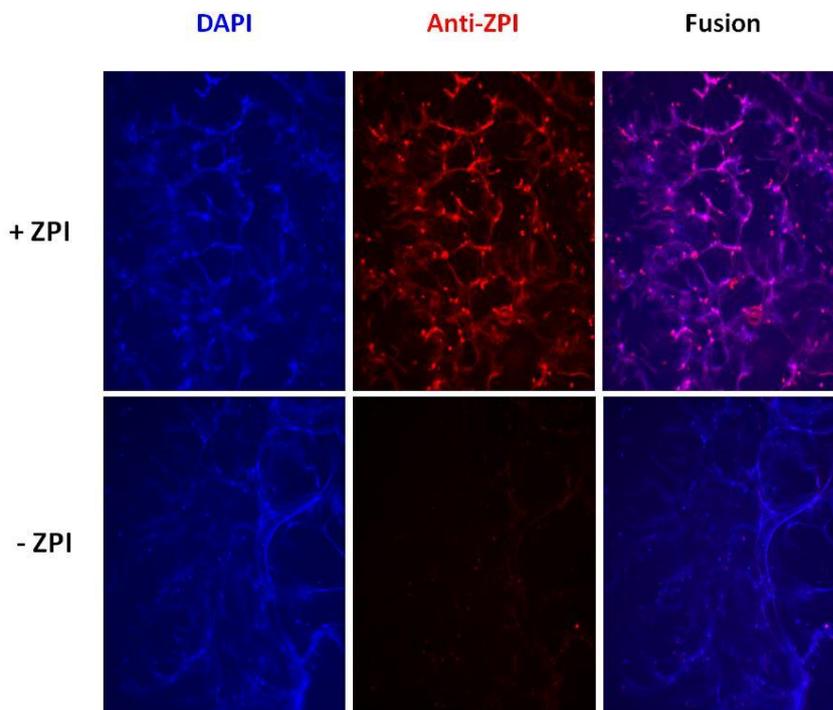
#### Technique de séquençage

Le séquençage N-terminal des produits de clivage du ZPI a été réalisée par la méthode de microséquençage d'Edman sur la plate-forme de Protéomique PISSARO (UMR 6270 CNRS-Faculté des Sciences de Rouen).

## Résultats

### Fixation du rhZPI sur les NETs

Tout comme d'autres protéines plasmatiques, le rhZPI, incubé sur les NETs *in-vitro*, est capable de se lier de façon spécifique aux fibres de chromatine extracellulaire. Les filaments d'ADN constituant les NETs libérés par les PNN au cours de la NETose sont colorés en bleu par le DAPI. Le rhZPI mis en évidence par immunofluorescence, apparaît en rouge et il est localisé sur les filaments d'ADN constituant les NETs (Figure 1).



**Figure 1: Fixation du rhZPI sur les NETs en immunofluorescence.**

*Après induction de la NETose, les PNN libèrent les NETs constitués de filament d'ADN (en bleu) décorées de protéines. En présence de ZPI, une fixation de ce dernier est observée (en rouge) et il est localisé sur les filaments d'ADN lorsque les deux images sont fusionnées (en violet).*

### Clivage du ZPI suite à sa fixation aux NETs

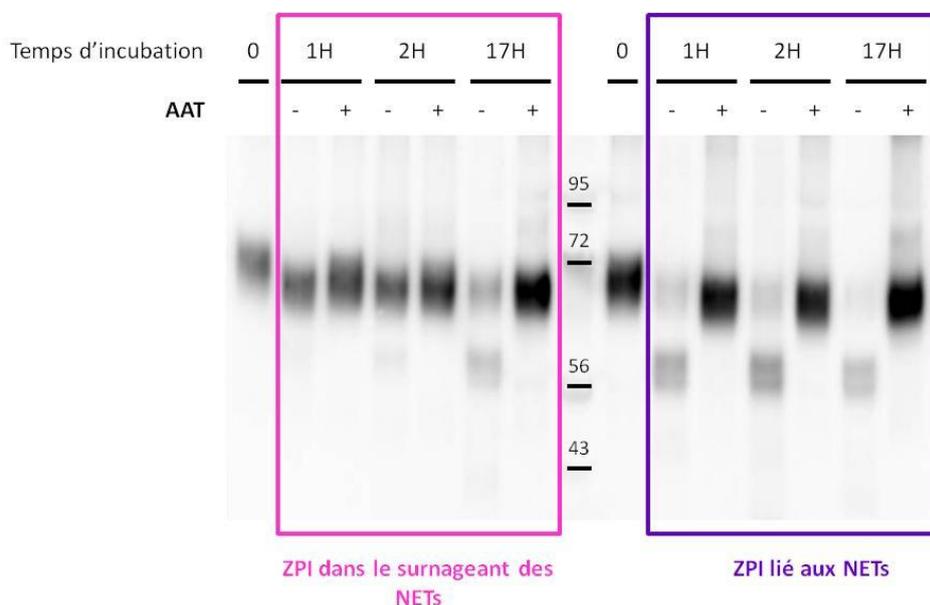
Parmi les enzymes neutrophiles décorant les NETs, plusieurs sont des protéases (élastase neutrophile (EN), catépsine G (CG), ou protéinase 3) susceptibles de cliver les protéines adsorbées à leur surface. Ce mécanisme est notamment impliqué dans l'activité procoagulante des NETs, puisque l'EN et la CG catalysent la dégradation du TFPI piégé dans les filaments

de chromatine extracellulaire. Ainsi nous nous sommes demandés si les NETs avaient un effet sur le ZPI et ses propriétés anticoagulantes lorsque celui-ci était adsorbé sur leur surface.

Le rhZPI est incubé sur les NETs à différents temps d'incubation en présence ou en absence d'AAT. Le surnageant des NETs contenant le ZPI libre a été collecté pour une analyse du ZPI par western-blot. En absence d'AAT, un clivage du ZPI est observé avec l'apparition d'une bande de plus faible masse moléculaire (environ 56 kDa) (Figure 2).

Par ailleurs, le ZPI fixé sur les NETs a aussi été collecté par dégradation des NETs à la DNase. La fraction de ZPI liée aux NETs subit aussi un clivage libérant un fragment de 56 kDa mais la cinétique de clivage du ZPI lié aux NETs est beaucoup plus rapide que celle du ZPI libre dans le surnageant des NETs. En effet le clivage du ZPI libre est observé après une incubation prolongée de 17 h sur les NETs, tandis que le ZPI lié aux NETs est déjà presque totalement clivé après 1 h d'incubation sur les NETs.

Ce clivage du ZPI, qu'il s'agisse du ZPI libre dans le surnageant des NETs, ou de la fraction de ZPI liée aux NETs, est totalement inhibé lorsque l'incubation est réalisée en présence d'AAT, suggérant que le clivage du ZPI est catalysé par l'EN ou d'autres serine-protéases neutrophiles inhibée par l'AAT.



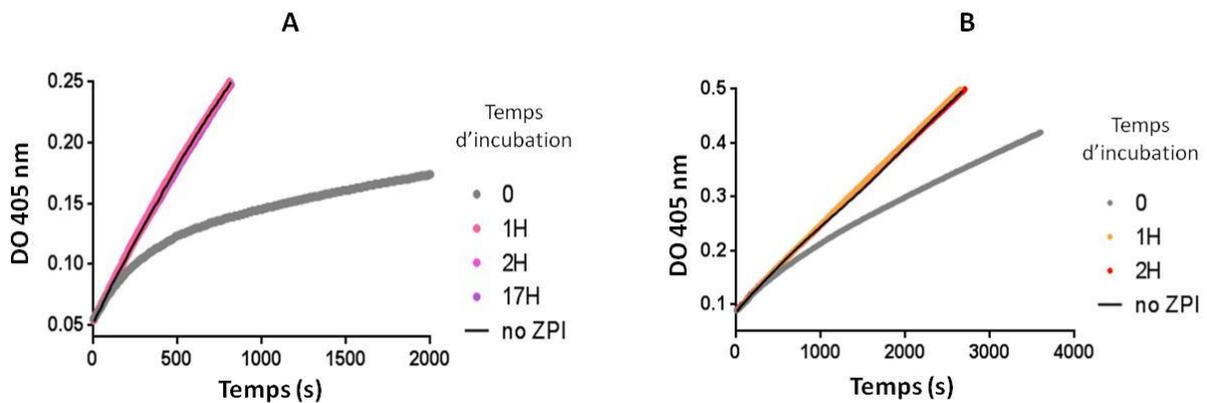
**Figure 2 : Effet des NETs sur le ZPI.**

*Le ZPI est incubé à différents temps sur les NETs (1 h, 2 h ou 17 h) en présence ou en absence d'alpha1-antitrypsine (AAT). Le surnageant cellulaire (encadré rose) ou la suspension contenant les protéines fixées aux NETs (encadré violet) ont été analysés en western-blot (gel de 4-12 % de polyacrylamide).*

### Perte de l'activité anticoagulante du rhZPI au contact des NETs

Le ZPI inhibe le FXIa seul et le FXa en présence de ses cofacteurs (la PZ, les phospholipides et le calcium). Nous avons montré que le ZPI est clivé suite à sa fixation sur les NETs, nous avons voulu vérifier par la suite si ce clivage entraîne une perte de l'activité anticoagulante du ZPI.

Le rhZPI a été incubé avec les NETs, et l'activité anticoagulante du rhZPI dans le surnageant a été analysée. L'incubation du rhZPI en présence de NETs s'accompagne de la perte totale des activités anti-FXIa et anti-FXa (Figure 3). Il faut remarquer que cette perte d'activité du rhZPI apparaît dès 1 heure d'incubation avec les NETs, alors que dans les mêmes conditions, le clivage du rhZPI avec libération d'un produit à 56 kDa n'est constaté qu'après 17 h d'incubation en Western-Blot.



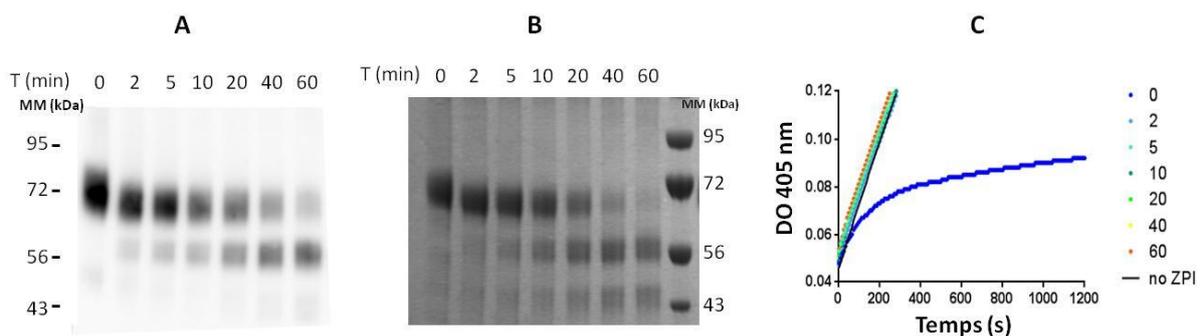
**Figure 3 : Activité anticoagulante du rhZPI après son incubation sur les NETs.**

*A) Activité du FXIa (400 pM) en absence (courbe noire) ou en présence de 140 nM de rhZPI (T= 0, courbe grise), ou en présence de rhZPI qui a été incubé 1 h, 2 h ou 17 h (courbe orange, rose, et violette respectivement) avec les NETs. B) Activité du FXa (2,5 pM) en absence (courbe noire) ou en présence de 50 nM de rhZPI (T= 0, courbe grise) ainsi que de ses cofacteurs (50 nM de PZ, 25  $\mu$ M de phospholipides et 10 mM de CaCl<sub>2</sub>). L'activité du FXa en présence du rhZPI incubé 1 h ou 2 h avec les NETs sont les courbes orange et rouge respectivement.*

Comme environ 60 % du ZPI circule dans le plasma sous forme de complexe avec la PZ, nous avons recherché si la présence de PZ exerçait un effet protecteur sur la protéolyse induite par les enzymes à la surface des NETs. Cependant, malgré la présence de la PZ, le rhZPI est fixé à la surface des NETs et perd tout aussi bien la totalité de son activité anticoagulante.

## Clivage et inactivation du rhZPI par l'élastase neutrophile (EN)

Le clivage du rhZPI à la surface des NETs étant inhibé en présence d'AAT, nous avons donc émis l'hypothèse que ce clivage pouvait être induit par l'EN, sachant que plusieurs potentiels sites de clivage par l'EN sont remarqués sur la séquence du ZPI. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons regardé l'effet d'une incubation de rhZPI avec de l'EN purifiée. En présence de 400 mU/mL d'EN, dès 2 minutes d'incubation, le rhZPI est clivé avec l'apparition d'une bande de plus faible poids moléculaire (56 kDa) comparable à celle induite par les NETs (Figure 4A). Curieusement, en SDS-PAGE, une autre bande apparaît à environ 43 kDa (Figure 4B). Comme lorsqu'il est adsorbé à la surface des NETs, le rhZPI perd son activité anticoagulante en présence d'EN (Figure 4C). L'inactivation est précoce puisqu'en présence de 400 mU/mL d'EN, le rhZPI perd complètement son activité anti-FXIa dès 2 minutes après l'incubation.



**Figure 4 : Effets d'une incubation du rhZPI avec l'EN.**

*Le rhZPI (150 µg/mL) a été incubé pendant différents temps (T= 0 à 60 min) avec 400 mU/mL d'élastase neutrophile (EN). Les milieux réactionnels sont analysés en Western-Blot anti-ZPI (A) et en SDS-PAGE (B) puis l'activité du FXIa a été mesurée en présence du rhZPI incubé avec l'EN aux différents temps d'incubation (C).*

Un séquençage N-terminal a été réalisé avec les 2 produits de clivage du rhZPI par l'EN. Ainsi, les 2 sites de clivage ont été identifiés :

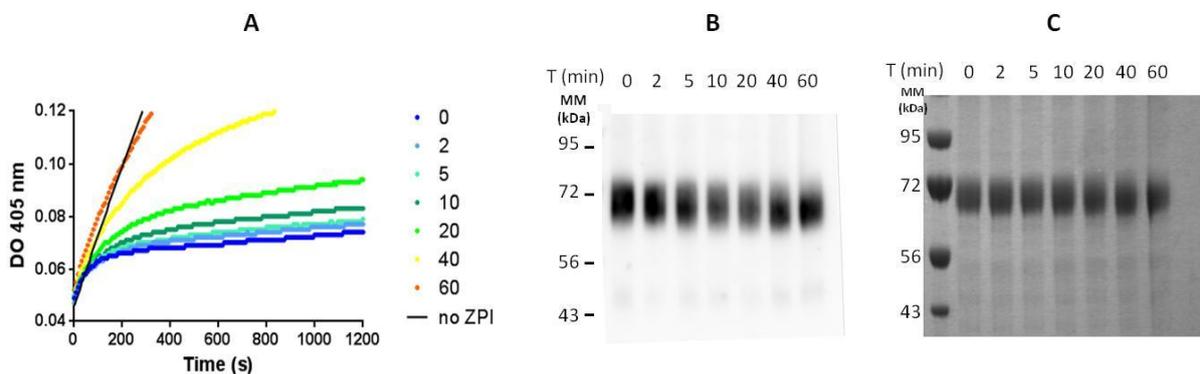
- Un clivage après la V21 ou V22, permettant de libérer un peptide de 56 kDa
- Un clivage après l'I103, permettant de libérer un peptide de 43 kDa

Ces clivages se produisent donc dans le premier quart de la partie N-terminale du rhZPI.

### La perte de l'activité anticoagulante du rhZPI en présence d'EN est précoce

Les résultats précédents montrent une différence notable entre les cinétiques de clivage et d'inactivation du ZPI. En effet, en présence d'une concentration élevée d'EN (400 mU/mL) alors que le clivage du ZPI est progressif sur une échelle de temps de 0 à 60 min, la perte de l'activité anti-FXIa du ZPI est immédiate et observée dès 2 min d'incubation du ZPI avec l'EN. Nous avons recherché la concentration d'EN à incuber avec le rhZPI permettant d'observer une perte progressive de l'activité anti-FXIa du rhZPI avec le temps. Cette zone de sensibilité est acquise en diminuant la concentration de l'EN à 5 mU/mL (Figure 5A), une perte de l'activité anti-FXIa est constatée, qui est proportionnelle au temps d'incubation du rhZPI avec l'EN, avec une perte totale de l'activité à 60 min d'incubation.

Par contre, en incubant le rhZPI avec 5 mU/mL d'EN, aucun des deux produits de clivage du rhZPI (56 ou 43 kDa) par l'EN, précédemment identifiés ne sont observés en western-Blot ou en SDS-PAGE (Figure 5B et 5C).



**Figure 5: Une faible concentration d'EN (5 mU/mL) induit une perte de l'activité anticoagulante du rhZPI sans les deux produits de clivage (56 kDa et 43 kDa) précédemment identifiés.**

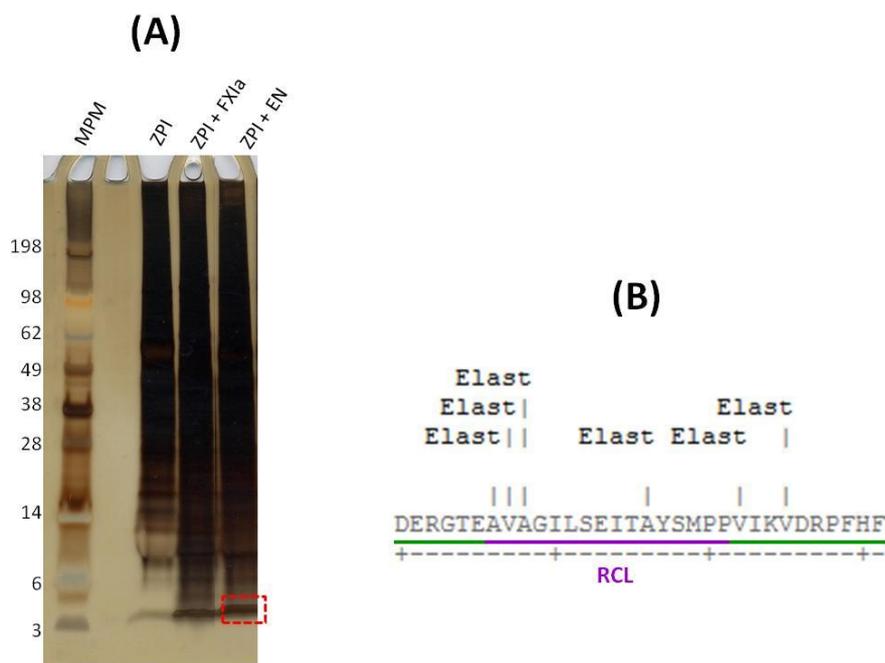
*Le rhZPI (150 µg/mL) a été incubé à différents temps (T= 0 à 60 min) avec 5 mU/mL d'élastase neutrophile (EN). (A) L'activité du FXIa a été mesuré en présence du rhZPI incubé avec l'EN à différents temps d'incubation. Les milieux réactionnels sont déposés en western-Blot anti-ZPI (B) et en SDS-PAGE (C).*

### L'EN entraîne un premier clivage précoce du rhZPI au niveau de sa boucle réactive

La perte totale d'activité du rhZPI incubé avec 5 mU/mL d'EN pendant 1 heure, sans qu'il n'y ait l'apparition des produits de clivage précédemment cités, laisse à penser qu'un premier

clivage du rhZPI pourrait survenir au niveau de sa boucle réactive. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'après incubation sur les NETs, un léger décalage du poids moléculaire du rhZPI est remarqué et disparaît en présence d'AAT (Figure 2).

La liaison du ZPI aux FXa ou FXIa entraîne un clivage au niveau de sa boucle réactive, libérant un peptide d'environ 4 kDa. Dans l'hypothèse où le clivage précoce du ZPI par l'EN clive aussi sa boucle réactive, un peptide au même poids moléculaire sera libéré. Ainsi, le produit de l'incubation du rhZPI avec l'EN a été analysé en électrophorèse mais cette fois-ci, en utilisant un gel à 20 % de polyacrylamide et une révélation par du nitrate d'argent pour améliorer la sensibilité (Figure 6).



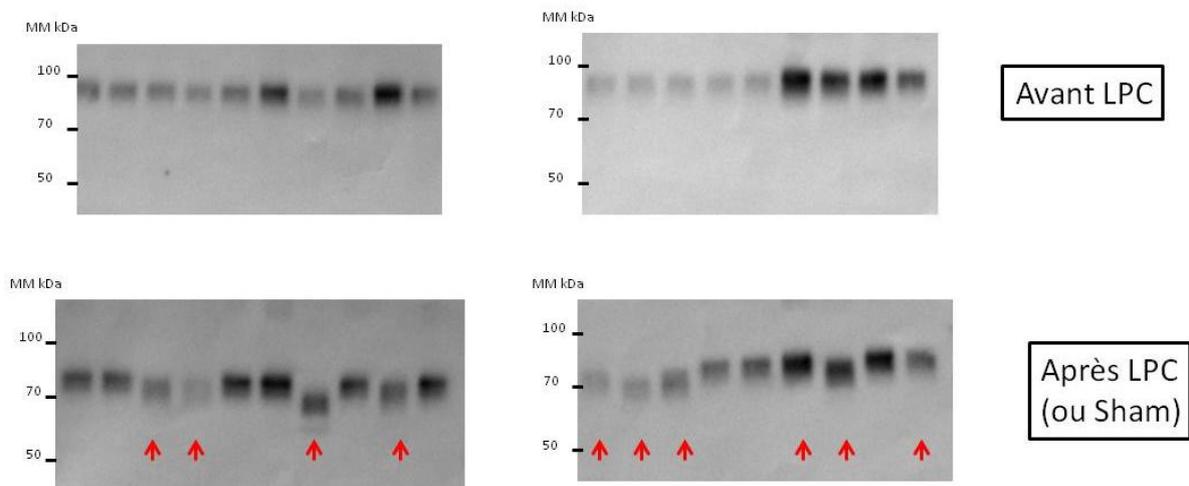
**Figure 6 :** Libération d'un peptide d'environ 4 kDa après l'incubation du rhZPI avec l'EN.

A) Après incubation avec l'EN ou le FXIa, le rhZPI est déposé en gel avec 20 % de polyacrylamide, MPM étant le marqueur de poids moléculaire et le peptide libéré par le rhZPI + EN est encadré en rouge. B) Schéma représentant les sites potentiels de clivage au niveau de la boucle réactive du ZPI (RCL) par l'EN.

Comme attendu, un peptide d'environ 4 kDa est libéré après l'incubation du rhZPI avec l'EN. Il est retrouvé au même niveau que le peptide libéré lors de l'incubation du rhZPI avec le FXIa. En analysant la séquence d'acides aminés au niveau de la boucle réactive du ZPI, 4 sites de clivage potentiels de l'EN ont été identifiés (Figure 6B).

## Clivage du ZPI retrouvé *in vivo* chez la souris dans un modèle de choc septique

Nous avons montré *in vitro* que le ZPI se fixe à la surface des NETs et qu'il est inactivé par l'EN, la relevance physiologique ces observations reste donc à démontrer. Au cours de la 1<sup>ère</sup> partie de mon travail de thèse, nous avons effectué un modèle de choc septique chez la souris (modèle LPC). L'analyse du profil électrophorétique du ZPI murin plasmatique chez ces souris a montré une diminution de la masse moléculaire du ZPI. Curieusement, la masse moléculaire du ZPI murin est la même (90 kDa) avant l'opération, par la suite, une diminution de cette masse moléculaire est observée (entre 4 et 40 kDa) mais seulement chez les souris dans le « groupe LPC » (Cf résultats 1<sup>ère</sup> partie, résultats supplémentaires).



**Figure 7: Variations de la masse moléculaire du ZPI murin chez les souris soumises à un modèle de choc septique (modèle ligature et ponction caecale, LPC).**

*Western-Blot anti-ZPI murin réalisé avec les plasmas des souris avant la LPC, n = 19 (en haut) et après la LPC, n = 10 (en bas, indiqué par la flèche rouge), les souris contrôles de la LPC sont aussi représentés, n = 9 (Sham, en bas sans les flèches rouges).*

## Discussion et conclusion

Le ZPI est un inhibiteur physiologique de la coagulation appartenant à la superfamille des serpines, il inhibe les FXa et FXIa de la coagulation, l'inhibition du FXa nécessitant la PZ. Comme le TFPI qui est un autre anticoagulant physiologique, le ZPI se fixe aussi à la surface des NETs en présence ou en absence de la PZ. Cette fixation entraîne la perte rapide de l'activité anticoagulante du ZPI qui est vraisemblablement médiée par l'EN à la surface des NETs. Lors de l'identification du ZPI en tant qu'inhibiteur des sérine-protéases, Han et coll. avaient mis le ZPI en présence d'EN et conclu que le ZPI n'inhibait pas l'activité enzymatique de l'EN mais ils n'avaient pas analysé l'effet de l'EN sur le ZPI (57).

En présence d'EN, une perte rapide de l'activité anticoagulante du ZPI est observée, sans qu'un clivage évident soit observé après migration sur gel de polyacrylamide. En effet, le ZPI recombinant présente une bande diffuse sur un gel de polyacrylamide ne permettant pas de bien distinguer la présence d'une faible variation de masse moléculaire, mais l'observation d'un peptide de 4kDa résultant de l'incubation du ZPI avec l'EN suggère qu'un clivage du ZPI au niveau de la boucle réactive a bien eu lieu.

Deux autres clivages successifs du ZPI sont induits par l'EN, libérant deux produits de clivage : un premier de 56 kDa, puis un deuxième à 43 kDa. Le peptide à 43 kDa n'a pu être observé en western-blot car il n'était pas reconnu par notre anticorps, cependant, la disparition de la bande à 56 kDa avec le temps orientait vers la présence d'un 2<sup>ème</sup> clivage, qui a pu être mis en évidence par une coloration des protéines totales après la migration sur un gel de polyacrylamide. Et sachant que l'expérience était réalisée en milieu purifié entre le ZPI et l'EN, et que l'EN a une masse moléculaire de 29 kDa, ce peptide de 43 kDa ne peut être que le produit de clivage du ZPI.

Dans un modèle de choc septique chez la souris, une diminution de la masse moléculaire du ZPI murin est observée par rapport au ZPI « natif », et la diminution importante et variable (entre 4 et 40 kDa) selon les souris suggèrent que ce clivage n'était pas induit seulement par le FXa ou FXIa. Il est donc possible que cette variation de la masse moléculaire du ZPI murin soit due à un clivage par l'EN, ce qui montre la relevance *in vivo* de ce clivage du ZPI par l'EN, dont une partie se trouve à la surface des NETs.

### **3<sup>ème</sup> partie : Etude des variations du taux de PZ et ZPI au cours du choc septique**

#### **Introduction**

Le sepsis est une dysfonction d'organe secondaire à une dérégulation de la réponse de l'hôte à l'infection et menaçant le pronostic vital. Le choc septique est un sepsis, caractérisé par des anomalies circulatoires nécessitant l'utilisation d'amines vasoactives. La formation de fibrine au cours du sepsis permet d'emprisonner les bactéries et d'empêcher leur propagation, mais toutefois l'activation de la coagulation nécessaire à la formation de ces dépôts fibrineux peut aussi conduire à l'apparition d'une CIVD, responsable de défaillance multiviscérale.

La CIVD implique une interrelation étroite entre cellules endothéliales, polynucléaires neutrophiles, monocytes et plaquettes. Les paramètres biologiques qui permettent de prédire la survenue d'une CIVD ne sont pas encore bien identifiés. Actuellement, deux systèmes de scores sont largement utilisés et permettent d'identifier une CIVD : un score proposé par l'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) (213) et un autre par le *Japanese Association for Acute Medicine* (JAAM) (211). La limitation principale du score de l'ISTH est l'absence de prise en compte de l'état inflammatoire du patient, qui est amélioré par le score JAAM par l'observation de la cinétique du taux des plaquettes. Cependant, ces scores rendent finalement peu service en pratique clinique. En effet, ils permettent de diagnostiquer un état de CIVD, mais à notre connaissance il n'existe pas de test permettant de savoir si un sujet en choc septique va évoluer ou non vers une CIVD qui expliquerait une défaillance d'organe. Il semble donc utile d'identifier des biomarqueurs permettant de répondre à cette question.

Plusieurs études ont déjà analysé les variations des facteurs de coagulation et des inhibiteurs physiologiques de la coagulation dans le sepsis, ainsi que leur valeur pronostique. Une étude a étudié les variations de PZ au cours du sepsis (269), en comparaison notamment avec les autres inhibiteurs physiologiques de la coagulation, toutefois aucune étude, à ce jour et à notre connaissance, n'a rapporté les variations du taux de ZPI. Nous avons donc analysé les variations des taux plasmatiques du ZPI chez des patients atteints de choc septique et nous avons comparé ces variations à celles de la PZ, cofacteur du ZPI. Ce travail a été effectué en collaboration avec le service de réanimation du CHU de Strasbourg, qui dispose d'une biobanque de patients atteints de choc septique.

## Matériels et méthodes

### Patients

Cents patients adultes (18 à 85 ans) ayant un choc septique ont été inclus dans l'étude après leur admission dans un service de réanimation. Les patients présentant une atteinte cardiaque importante (classe IV du NYHA) ou hépatique (classe C du Child-Pugh), ou atteints de cancer ont été exclus. Les patients avaient un âge moyen de  $61,5 \pm 15$  ans et 64 % étaient de sexe masculin. Le site d'infection des patients est majoritairement pulmonaire, urinaire ou abdominal. Tous les patients avaient un traitement aux amines vasopressives, selon l'état du patient, d'autres traitements pouvaient être ajoutés comme une épuration extra-rénale, l'administration de plasma frais congelé, de plaquettes, d'héparine ou de la protéine C activée. Les microorganismes pathogènes étaient des cocci Gram (+), des entérobactéries, des bacilles Gram (-) ou de nature indéterminée.

Un patient de l'hôpital Foch (Suresnes, France) de 63 ans et de sexe masculin a complété l'analyse du profil électrophorétique du ZPI en western-blot. Il était en choc septique dû à une colite ischémique. Il avait un taux de fibrinogène à 5,4 g/L, les cofacteurs du taux de prothrombine étaient tous diminués (FII : 46 %, FV : 47 %, FVII : 51 %, et FX : 41 %).

### Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins ont été réalisés dès le diagnostic d'un choc septique (J1), avant tout traitement, pour éviter les biais thérapeutiques. Les patients ont également été prélevés après 3 et 7 jours (J3 et J7). Le plasma citraté obtenu après une double centrifugation à 2500 g pendant 15 minutes a été conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Critères de CIVD

Le score de CIVD était calculé selon les critères de l'ISTH 2001 et du JAAM 2006. Une CIVD précoce est confirmée si le score de JAAM, qui permet de tenir compte de la réponse inflammatoire par une évaluation de la dynamique des plaquettes, est supérieur ou égal à 4 durant les premières 24 h de l'admission (J1) ou à J2.

### Dosage du ZPI et de la PZ

Le ZPI a été dosé par un dosage immunoenzymatique consistant à l'utilisation de deux anticorps différents dirigés contre le ZPI, un premier pour la capture du ZPI sur la plaque et

un deuxième couplé à la peroxydase pour la révélation. (Cf protocole ELISA dans la 1<sup>ère</sup> partie, Résultats supplémentaires – Matériels et méthodes).

La PZ a été dosée par un kit commercial Zymutest<sup>TM</sup> (Hyphen Bio-med, France). Le protocole était celui recommandé pour l'utilisation du kit.

### Western-Blot

Un pool de plasma de témoins sains est utilisé comme contrôle (dilution 1/25 ou 1/50) et les plasmas des patients sont dilués comme le contrôle (dilution 1/25 ou 1/50) (20 µL/dépôts).

Le protocole du western-blot est le même que dans la 1<sup>ère</sup> partie de ce manuscrit (Résultats supplémentaires, matériels et méthodes). L'anticorps primaire est ajouté à la concentration de 0,6 µg/mL (ref : ABIN572295, Antibodies.online.com) et l'anticorps secondaire est un anticorps anti-mouton couplé à la peroxydase (Jackson IR, Angleterre), dilué à 1/20000.

### Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5. Un test One-Way ANOVA, avec un *t* test Bonferroni en multiples comparaisons, a été employé pour comparer les taux plasmatiques de PZ ou ZPI entre eux à différents jours de prélèvement. Nous avons considéré comme significatif une valeur de  $p < 0,05$ .

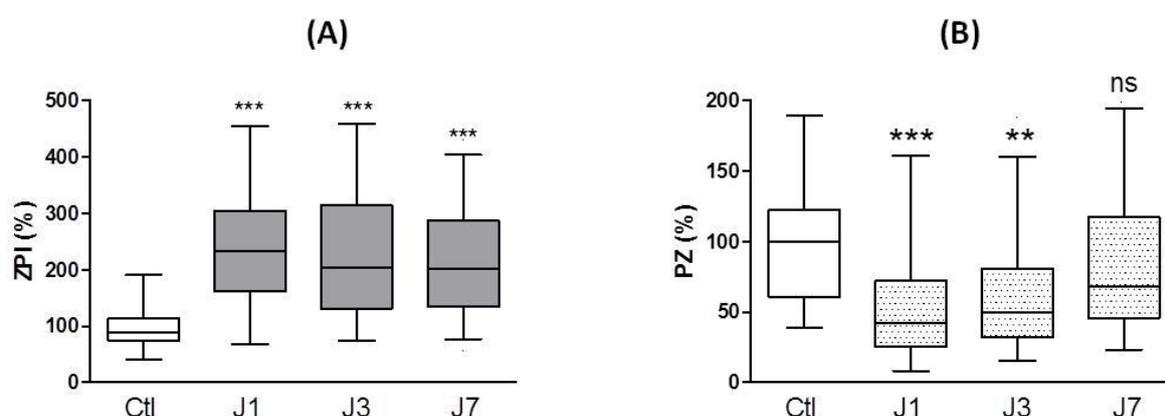
## Résultats

### *Patients en choc septique : taux élevé de ZPI et taux faible de PZ*

Tous les patients avaient un choc septique à leur admission et 92 patients ont été étudiés, huit patients ont été exclus (six pour l'absence d'échantillon et deux pour des critères d'exclusion inconnue à l'admission).

A l'admission des patients (J1), le taux plasmatique du ZPI était élevé ( $246 \pm 12$  %) comparé à un groupe de témoins sains ( $3,88 \pm 0,25$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0,001$ ). Ce taux élevé de ZPI persiste pendant 7 jours bien qu'une tendance à la baisse soit observée à J7 ( $222 \pm 11$  %) sans qu'elle ne soit significative par rapport au taux à J1. Le taux de ZPI à J7 reste significativement plus élevé que chez les témoins sains (Figure 1A).

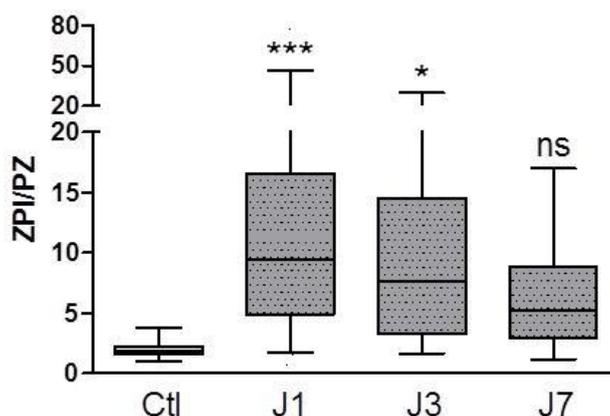
Inversement aux taux de ZPI, le taux plasmatique de PZ est significativement plus faible chez les patients à leur admission ( $57 \pm 4$  %) par rapport au groupe de témoins sains ( $2,07 \pm 0,15$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0,001$ ). Par contre, une augmentation progressive est observée tout au long de l'hospitalisation pour atteindre un taux comparable à ceux du groupe témoins à J7 ( $86 \pm 5$  %) (Figure 1B).



**Figure 1 : Variations des taux plasmatiques de ZPI et PZ chez les patients en choc septique.**

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à une population contrôle (Ctl, témoins sains). Témoins sains :  $n = 31$ , patients :  $n = 92$ . La médiane est représentée par la ligne horizontale dans le rectangle, les bords représentent 25-75 % centiles et les barres d'erreurs 5-95 % centile. Les tests statistiques sont effectués par rapport au groupe de témoins sains \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , ns : non significatif.

Les concentrations plasmatiques de ZPI et PZ étant corrélées (100), nous avons donc analysé le ratio du ZPI/PZ à J1, J3 et J7. Ainsi, le ratio ZPI/PZ est significativement plus élevé à l'admission et à J3 par rapport au ratio ZPI/PZ de groupe de témoins sains. Le ratio diminue progressivement jusqu'à se rapprocher du ratio observé chez les témoins sains à J7, la différence n'étant plus significative.



**Figure 2 : Variations du ratio des taux plasmatiques du ZPI/PZ chez les patients en choc septique (n = 92).**

*La médiane est représentée par la ligne horizontale dans le rectangle, les bords représentent 25-75 % centiles et les barres d'erreurs 5-95 % centile. Les tests statistiques sont effectués par rapport au ratio ZPI/PZ du groupe de témoins sains \*\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ , ns : non significatif*

### ***Corrélation avec les autres facteurs de la coagulation***

Comme déjà observé, les facteurs vitamine K-dépendants du complexe prothrombinique (FII, VII, FX) sont diminués au cours du choc septique (281), notamment lors de l'apparition des CIVD et évoluent en se normalisant après la prise en charge du patient. Nous avons recherché une corrélation entre ces facteurs et les taux de PZ et ZPI. Une corrélation positive est observée entre le taux plasmatique de PZ et des FII, FX ou FVII. Par contre, le taux plasmatique de ZPI n'est corrélé à aucun de ces trois protéines (tableau 1).

**Tableau 1: Corrélation entre les taux plasmatiques de PZ et ZPI avec les FXII, FX et FVII de la coagulation chez les patients en choc septique (n = 224)**

Facteurs analysés	Corrélation	Coeff. de corrélation de Spearman (r)	p value
PZ - FII	OUI	0,560	< 0,001
PZ - FX	OUI	0,459	< 0,001
PZ - FVII	OUI	0,428	< 0,001
ZPI - FII	NON	-0,038	0,638
ZPI - FX	NON	-0,020	0,805
ZPI - FVII	NON	0,058	0,474

***Absence de corrélation du taux plasmatique de ZPI avec celui du fibrinogène***

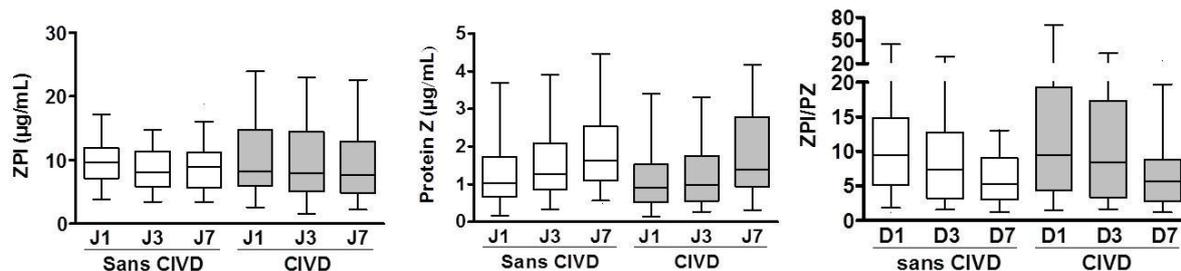
Comme le fibrinogène est aussi une protéine de l'inflammation, nous avons voulu vérifier si l'augmentation du taux plasmatique de ZPI était corrélée avec celle du fibrinogène. Il n'y a pas de corrélation significative entre les deux valeurs ( $r = -0,134$  ;  $p = 0.1942$ ).

***Evolution des taux plasmatiques du ZPI et de la PZ, ou du ratio ZPI/PZ chez les patients ayant une CIVD et chez ceux qui avaient une CIVD précoce***

Nous avons analysé le taux plasmatique des patients qui ont eu une CIVD précoce comparé à ceux qui n'en développaient pas.

Suivant le score JAAM 2006, la CIVD précoce, c'est-à-dire dans les premières 24 heures après l'admission ou à J2, a été observée chez 38 patients qui étaient en choc septique. Ces patients avaient un score de SOFA et de SAPS2 élevés ( $p < 0,001$  et  $p < 0,01$  respectivement), ainsi qu'une insuffisance rénale aigüe plus fréquente.

Les taux plasmatiques de ZPI ne diffèrent pas entre les deux groupes de J1 à J7, les taux plasmatiques moyens restent élevés et similaires entre les patients qui ont présentés ou non une CIVD précoce. De même pour les taux plasmatiques de PZ et les ratios ZPI/PZ, les deux groupes de patients (avec et sans CIVD) suivent le même profil d'évolution entre J1 et J7, caractérisé par une augmentation progressive du taux de PZ et une diminution du ratio ZPI/PZ pendant les 7 jours d'observation.



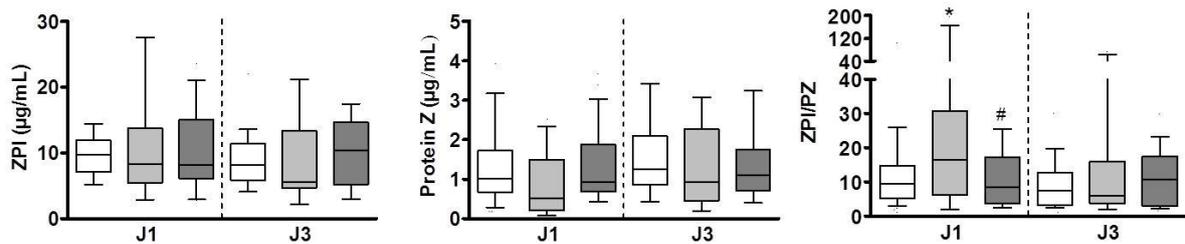
**Figure 3 : Taux plasmatiques de ZPI et PZ, ou ratio ZPI/PZ chez des patients en choc septique en fonction de la présence d'une CIVD précoce.**

*Les taux plasmatiques des patients sans CIVD sont représentés en boîte blanche (n = 54) tandis que ceux des patients ayant eu une CIVD sont représentés en boîte grise (n = 38). La médiane est représentée par la ligne horizontale dans le rectangle, les bords représentent 25-75 % centiles et les barres d'erreurs 5-95 % centiles*

A leur admission, les patients du groupe CIVD avait des paramètres biologiques mixtes. Ils avaient une élévation des D-dimères modérée mais dont le taux restait identique à celui des patients sans CIVD, un taux plaquettaire plus faible que les patients sans CIVD mais qui reste au-dessus de la limite du score JAAM (ou ISTH), et une faible activation plaquettaire (le ratio GPV soluble/plaquettes était normal). Mais ces patients ont clairement une CIVD par la suite avec une augmentation des D-dimères, une diminution du compte plaquettaire ainsi qu'une activation plaquettaire évidente, mais ne sont pas distinguables avec les autres à leur admission.

Le groupe de patients avec CIVD précoce a été divisé en 2 groupes : un groupe « pré-CIVD » avec une CIVD qui n'apparaît qu'à J3 et un groupe CIVD dont la CIVD se déclenche dans les premières 24 h après l'admission. Le groupe pré-CIVD représentait 11 patients dans notre cohorte. Les taux plasmatiques de ZPI et de PZ, ainsi que le ratio ZPI/PZ ont donc été observés dans les 3 groupes de patients : le groupe sans CIVD, le groupe en « pré-CIVD » et le groupe CIVD.

Les taux plasmatiques du ZPI et de la PZ sont similaires entre les 3 groupes de patients. Le ratio ZPI/PZ est plus élevé à (J1) chez les patients dans le groupe pré-CIVD par rapport au groupe sans CIVD, mais il reste similaire entre le groupe sans CIVD et avec CIVD, le ratio ZPI/PZ ne présente pas de différence significative à J3 entre les 3 groupes (figure 4).



**Figure 4: Les taux plasmatiques de ZPI et PZ, ou le ratio ZPI/PZ chez des patients en choc septique.**

Les taux plasmatiques des patients sans CIVD sont représentés en boîte blanche ( $n = 54$ ), ceux qui ont une « pré-CIVD » en boîte gris clair ( $n = 11$ ) et ceux qui ont une CIVD en gris foncé ( $n = 27$ ). La médiane est représentée par la ligne horizontale dans le rectangle, les bords représentent 25-75 % centiles et les barres d'erreurs 5-95 % centiles.

\* $p < 0,05$  par rapport au groupe sans CIVD, # $p < 0,05$  par rapport au groupe pré-CIVD

### ***Le taux plasmatique de ZPI n'est pas prédictif de la mortalité***

En comparant les taux plasmatiques de ZPI chez les patients décédés et ceux qui ont survécu, aucune différence significative n'est remarquée, le taux de ZPI ne permet donc pas de prédire la mortalité à 28 jours.

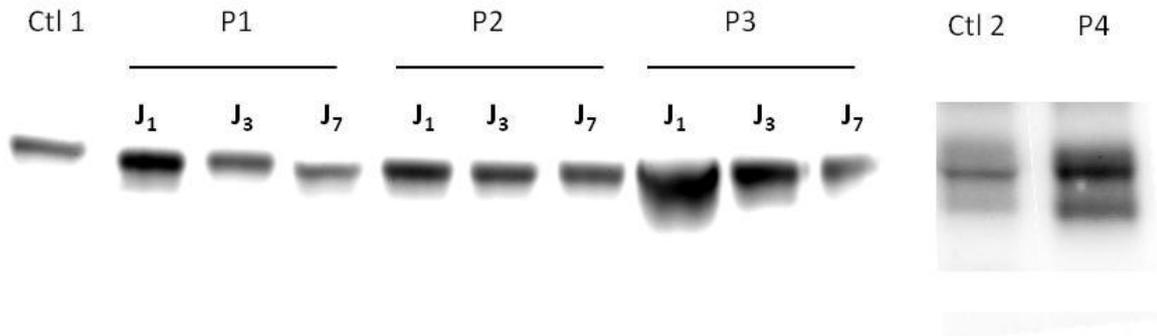
**Tableau 2 :** Comparaison du taux plasmatique de ZPI, à J1, J3 et J7 chez les patients en choc septique ayant survécu ou décédés.

	Taux plasmatiques de ZPI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		<i>p value</i>
	Patients ayant survécu	patients décédés	
J1	$10,39 \pm 4,87$	$9,07 \pm 5,44$	0,2
J3	$9,18 \pm 4,98$	$9,14 \pm 5,24$	0,47
J7	$8,89 \pm 4,48$	$8,66 \pm 4,48$	0,89

### ***Observation d'un clivage du ZPI humain plasmatique chez un patient en choc septique***

Une augmentation du taux plasmatique du ZPI a aussi été observée chez la souris dans un modèle de choc septique (LPC), résultats présentés au cours de la 1<sup>ère</sup> partie de ce travail, et nous avons observé un clivage du ZPI plasmatique (page 121). Le profil électrophorétique du ZPI plasmatique de quelques patients de cette cohorte ont alors été analysés, ainsi qu'un patient en choc septique de l'hôpital Foch, afin de rechercher si le clivage était également observé chez l'homme.

Nous avons bien sûr confirmé par western-blot l'augmentation du taux plasmatique du ZPI identifiée par ELISA, et la diminution au cours du temps pour les trois patients (P1, P2 et P3) de la cohorte. Chez le patient P4, une deuxième bande de plus faible masse moléculaire (perte entre 4 et 10 kDa) est observée alors que le ZPI était retrouvé « intact » chez les patients P1, P2 et P3 (figure 5).



**Figure 5 : Présence ou non d'un clivage du ZPI plasmatique chez les patients en choc septique (CS).**

*Western-blot anti-ZPI avec les plasmas de patients en choc septique. Les contrôles (Ctl 1 et Ctl 2) sont des plasmas d'un pool de témoins sains. P1, P2 et P3 étaient les plasmas de patients en CS de la cohorte de Strasbourg (Cf 3<sup>ème</sup> partie du manuscrit) prélevés à différents temps (J1, J4 ou J7), et P4 était un patient en CS de l'hôpital Foch. Les mêmes volumes de plasmas ont été déposés pour la migration sur gel pour Ctl 1, P1, P2 et P3 (dilution 1/25) ainsi que pour Ctl 2 et P4 (dilution 1/50).*

## Discussion et conclusion

Le taux plasmatique de ZPI est élevé chez les patients en choc septique dès leur admission au service de réanimation (J1), ce qui n'est pas surprenant sachant que le ZPI a été décrit comme protéine de l'inflammation chez l'homme (1). L'augmentation est en moyenne 2,5 fois plus élevée que la concentration moyenne d'un groupe de sujets sains, elle est donc beaucoup plus importante que l'augmentation observée chez les patients après une chirurgie ou dans des cancers inflammatoires, où une augmentation de seulement 20-30 % a été observée (1,2). Cette forte augmentation pourrait être le reflet de la présence d'un état inflammatoire excessif chez les patients en choc septique. L'augmentation du taux de ZPI n'est pas corrélée à celle du fibrinogène, qui est aussi une protéine de l'inflammation, suggérant que les taux plasmatiques des deux protéines ne sont pas régulés par le même mécanisme dans le sepsis. Cela contraste avec l'observation de Doat et coll. chez les patients avec un cancer pancréatique où une corrélation, certes faible, était observée ( $r = 0,28$ ,  $p = 0,054$ ) (2). De même, une faible corrélation a aussi été observée dans un groupe de patients après une ovariectomie ( $R^2 = 0,01$ ,  $p < 0,007$ ) (1).

Inversement, le taux plasmatique de la PZ est faible (50 %) par rapport à des sujets sains, mais remonte pour revenir à la normale après une semaine d'hospitalisation. La baisse de PZ est corrélée à celle du FII, FX et FVII, suggérant une diminution par consommation au cours du choc septique, par activation de la coagulation.

Les taux plasmatiques de ZPI ou de PZ sont comparables entre les patients en choc septique ayant eu ou non une CIVD précoce. Sachant que les anticoagulants physiologiques sont consommés au cours du choc septique (Cf antithrombine et Protéine C), le taux plasmatique de ZPI reste élevé même chez les patients avec une CIVD précoce, permettant d'envisager soit que le ZPI n'est pas impliqué dans la réponse antithrombotique au cours du choc septique, même en présence d'une CIVD, soit que l'organisme compense la consommation du ZPI par une production accrue. Cependant, la PZ est diminuée, cela suggère que le système anticoagulant PZ/ZPI est impliqué au cours du choc septique, ce qui plaide donc en faveur d'une production accrue du ZPI au cours du choc septique.

Le ratio ZPI/PZ permet de voir la présence ou l'absence de corrélation des taux plasmatiques de la PZ et du ZPI et permet en même temps d'apprécier la part libre du ZPI plasmatique. Le ratio ZPI/PZ est élevé chez les patients à l'admission par rapport au ratio chez les témoins

sains, montrant un taux plus élevé de ZPI libre, cependant ce ratio évolue de la même manière entre les patients avec et sans CIVD. Les taux plasmatiques de ZPI ou PZ, ni le ratio ZPI/PZ ne permettent donc d'identifier un patient avec une CIVD précoce.

Trois groupes de patients ont par la suite été établis, dont le groupe « pré-CIVD » où les patients allaient présenter une CIVD à J3. Nous avons cherché à savoir si l'évolution des taux plasmatiques de ZPI et de PZ, ou celle du ratio ZPI/PZ permettaient d'anticiper la CIVD chez ces patients. Les taux plasmatiques de ZPI et PZ ne sont pas significativement différents entre les 3 groupes de patients à l'admission. Curieusement, le ratio ZPI/PZ est significativement plus élevé dans le groupe « pré-CIVD » à J1 par rapport aux groupes sans CIVD et avec CIVD. Mais comme la présence de CIVD ne change pas le ratio, il est difficile de trouver une utilisation de cette variation en pratique.

Enfin, les taux plasmatiques de ZPI (et de la PZ) ne permettent pas de prédire la mortalité à 28 jours chez les patients en choc septique. Nous avons montré dans la première partie de cette thèse que les effets anti-inflammatoires (réduction d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ ) du ZPI n'étaient apparents qu'à des concentrations élevées de ZPI (4 à 5 fois la concentration physiologique de ZPI). Malgré l'augmentation importante de ZPI observée chez les patients en choc septique, peu de patients (2 seulement) ont atteints ces taux de ZPI.

Pour conclure, une variation des taux plasmatiques du ZPI et de la PZ est observée chez les patients en choc septique, suggérant une implication du système PZ/ZPI au cours de l'inflammation et/ou de la coagulation mis en œuvre dans cette pathologie. La diminution du taux plasmatique de PZ suggère sa consommation et donc la participation du système anticoagulant PZ/ZPI dans la coagulopathie du choc septique, et l'augmentation importante du taux plasmatique du ZPI pourrait correspondre à une réponse de défense de l'organisme, mais encore insuffisante pour améliorer la survie des patients.



## **Discussion générale et perspectives**



Le ZPI est une protéine physiologique découverte il y a une vingtaine d'années, mais son rôle physiopathologique reste encore mal connu : en effet, peu d'études ont été menées pour comprendre son importance justifiant sa conservation tout au long de l'évolution. A cet égard, il faut souligner que le ZPI est retrouvé chez différents mammifères, le rapport PZ/ZPI étant toutefois différent selon les espèces. L'isolement du ZPI a permis de montrer qu'il inhibe les facteurs Xa et XIa de la coagulation, l'inhibition du FXa nécessitant la PZ (57). Cependant, le principal inhibiteur du FXa dans le plasma reste l'antithrombine, dont la concentration est plus de 30 fois plus élevée que celle du ZPI dans le plasma. Quant à l'inhibition du FXIa, elle ne semble pas indispensable pour l'hémostase physiologique, et les systèmes sont redondants, notamment l'AT, la protéase-nexine-1 ou le C1-inhibiteur peuvent exercer ce rôle (282,283). Chez la souris, il a été montré que les souris déficitaires en ZPI sont viables et sans trouble particulier en absence de facteurs de risques surajouté de thrombose. Ainsi, le croisement de souris déficitaires en ZPI avec des souris ayant le facteur V Leiden conduit à une mortalité par thrombose de toutes les souris à 6 semaines. De même, l'application des différents modèles de thrombose (application de FeCl<sub>3</sub> ou injection de collagène/adréraline) entraîne une mortalité plus importante chez les souris déficitaires en ZPI (81). Ces données chez la souris laissent donc à penser que l'inhibition du facteur XIa par le ZPI est plus importante que ce qu'on avait envisagé jusqu'à présent. Chez l'Homme, peu d'études se sont intéressées aux variations physiopathologiques du taux plasmatique de ZPI, alors que le rôle de la PZ a davantage été étudié. Ainsi, il a été décrit qu'un déficit en PZ pourrait constituer un facteur de risque de thrombose artérielle (103). Cependant, il existe des différences entre les différentes études. Les discordances entre les résultats des différentes études proviennent en partie de l'origine ethnique des patients : en effet les taux plasmatiques de PZ des populations « contrôles » sont très différents d'un pays à l'autre, provenant sans doute de polymorphismes génétiques différents, puisqu'il a été montré que le taux plasmatique de PZ était très fortement associé à certains polymorphismes (A13G, G103A, G79A). Une hétérogénéité de répartition de certains polymorphismes de facteurs de la coagulation a déjà été identifiée (284), rapportés à un avantage en terme de survie dans les populations nordiques pour le FV Leiden (285). Les variations du taux de PZ ont-ils conférés un avantage d'adaptation au milieu ? Aucun élément ne nous permet d'y répondre à ce jour. Un autre facteur qui pourrait expliquer les résultats discordants des études chez l'Homme viennent des critères d'inclusion des patients et de l'interférence éventuelle de l'inflammation. En effet, Mc Quillan et coll. avaient suggéré que l'augmentation de PZ qu'ils avaient observées lors de la phase aigüe d'un AVC ischémique était due à une réaction inflammatoire, puisqu'à distance de l'AVC (3 mois après), ils

n'observaient plus de différence entre taux de PZ chez les patients et les contrôles (85). Cependant cette conclusion était peu probante, puisqu'ils ont comparé les valeurs moyennes de PZ chez 173 patients lors de leur admission, et ils n'avaient plus que 83 patients lors du contrôle à 3 mois et qu'ils n'ont pas réalisé d'étude appariée. De plus, il a été montré *in vitro* que la PZ n'était pas régulée par les cytokines de l'inflammation (129).

Cependant, dans un modèle d'inflammation aigüe chez la souris, il a été mis en évidence que le ZPI est une protéine de l'inflammation (79) et que l'augmentation de ZPI augmentait vraisemblablement la demi-vie de la PZ, puisque PZ et ZPI forment un complexe dans le plasma (78). Inversement, Butschkau et coll. ont observé dans un modèle d'inflammation systémique par injection de LPS par voie intraveineuse que les souris déficitaires en PZ ou en ZPI avaient une réponse inflammatoire supérieure à celle des souris sauvages, suggérant une relation entre le système PZ/ZPI et inflammation (268). Comme l'augmentation des protéines de la phase aigüe de l'inflammation a souvent comme finalité de diminuer l'intensité de la réponse inflammatoire, il était logique d'analyser si le ZPI ou la PZ pouvait diminuer les facteurs de l'inflammation, et plus particulièrement les cytokines pro-inflammatoires

J'ai montré au cours de ce travail que le ZPI diminuait la production d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  induite par du LPS, alors que la PZ n'a pas d'effet. Ceci a été montré dans un modèle en sang total, un modèle qui permet de prendre en compte les interactions complexes entre les cellules sanguines en réponse à une stimulation, sachant que les autres modèles *in vitro*, comme l'utilisation de la lignée de macrophage murine (RAW264.7), des cellules mononucléées ou des polynucléaires neutrophiles isolés ne permettent pas toujours d'identifier des effets biologiques (286,287). C'est le cas pour l'effet du ZPI, en effet, en utilisant des monocytes purifiés, nous ne pouvons pas mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire du ZPI. De la même façon, en utilisant la lignée monocyttaire THP-1, nous n'avons pas observé d'effet inhibiteur du ZPI sur la production de cytokines induite par le LPS. Le mécanisme moléculaire qui sous-tend cet effet inhibiteur sur la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires induite par le LPS reste cependant à préciser.

Nous avons envisagé 2 hypothèses : un effet résultant de l'inhibition de la coagulation par le ZPI et qui nécessite donc le site actif, et un effet qui serait indépendant de ce site actif.

L'analyse du variant du ZPI muté sur sa boucle réactive (ZPI Y387A) a montré qu'il avait toujours un effet anti-inflammatoire, mais plus faible que celui du ZPI natif, ce qui suggère une implication de cette boucle réactive dans l'effet anti-inflammatoire. Actuellement, les

seules sérine-protéases connues pour être inhibées par le ZPI sont les FXa et FXIa, qui lui confère une activité anticoagulante, ce qui impliquerait qu'une partie de l'effet anti-inflammatoire du ZPI passerait par son activité anticoagulante. Cependant, comme l'ajout de PZ, qui est le cofacteur indispensable du ZPI pour l'inhibition du FXa n'amplifie pas son action anti-inflammatoire, il est peu probable que l'effet anti-inflammatoire du ZPI passe par l'inhibition de ce facteur. De plus, dans mes conditions expérimentales, la concentration de citrate a été ajustée de façon à ce qu'il n'y ait pas d'activation de la coagulation, ce que nous avons pu constater en observant qu'il n'y avait pas d'augmentation du taux de complexe thrombine-antithrombine (TAT) après les 20 heures d'incubation, même en présence de LPS (résultats non montrés). En revanche, l'activation de la phase contact de la coagulation, impliquant les facteurs XIa et XIIa, n'est pas dépendante de la présence de calcium. De plus, les données de la littérature suggèrent un lien entre FXI et inflammation : en effet les souris déficitaires en FXI ont une réponse inflammatoire diminuée dans un modèle de choc septique (265), de même l'inhibition de l'activation du FXI par l'anticorps 14E11 s'accompagne d'une diminution de l'inflammation dans un modèle murin de sepsis. On pouvait donc envisager qu'une partie de l'effet anti-inflammatoire du ZPI passe par l'inhibition du FXIa. Il faut souligner cependant qu'aucun mécanisme n'a été publié expliquant la diminution de production de cytokines pro-inflammatoires chez les souris déficitaires en FXI ou dont l'activation du FXI a été inhibée.

Nous avons donc recherché si le FXIa n'avait pas un effet pro-inflammatoire direct, en utilisant les cellules mononuclées sanguines (monocytes et lymphocytes) au cas où l'effet pro-inflammatoire nécessiterait une coopération cellulaire. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence d'effet pro-inflammatoire direct du FXIa, qu'il soit ajouté seul ou conjointement avec du LPS. En effet, il a été montré que le FXIIa seul n'induit pas la sécrétion de cytokines par les monocytes mais amplifie la sécrétion induite par le LPS (185). En 2017, Bane et coll. ont montré que le FXIa contribue à l'amplification de la production du FXIIa et aux effets pro-inflammatoires de la voie du système contact dans un modèle de choc septique chez la souris. Nous avons donc recherché si l'inhibition du FXIa par le ZPI n'induisait pas une diminution de génération de FXIIa, responsable d'une diminution de cytokines pro-inflammatoires. Nous avons effectué des western-blots pour rechercher l'activation du FXII dans notre modèle en sang total. Alors que nous avons pu observer la génération de FXIIa dans du plasma activé par de la silice, nous n'avons pas observé de FXIIa en ajoutant de la

silice en sang total (résultats non montrés), ce qui suggère soit que le FXIIa reste fixé sur des surfaces cellulaires, soit est très vite clairancé par les leucocytes.

Il semble pourtant qu'une protéine plasmatique soit impliquée, puisque si nous n'avons pas observé d'effet inhibiteur du ZPI sur des monocytes isolés, l'addition de plasma sur des monocytes purifiés permet d'observer un faible effet inhibiteur du ZPI. Toutefois, l'effet inhibiteur du ZPI est toujours observé même en présence de plasma déficient en FXII ou en FXI, ce qui suggère que l'inhibition du FXa ou FXIa par le ZPI ne contribue pas à l'effet anti-inflammatoire observé. Par conséquent, on peut émettre l'hypothèse que le ZPI interagisse ou inhibe une autre sérine-protease non encore identifiée, qui elle, exerce un effet pro-inflammatoire. Enfin, on ne peut exclure que le variant ZPI Y387A ait subi une modification conformationnelle comparé au ZPI natif diminuant ainsi son activité anti-inflammatoire.

En sang total, nous avons observé que le ZPI induit la sécrétion précoce de CCL5 (ou RANTES), une chimiokine impliquée dans le recrutement leucocytaire. Le CCL5 est connu comme étant une chimiokine pro-inflammatoire. *In vitro*, le LPS et l'exotoxine des staphylocoques stimulent la production de CCL5 par les cellules mononucléées sanguines, qui est amplifiée en présence des cellules épithéliales pulmonaires (288). En se fixant sur ses récepteurs (principalement CCR1, CCR3 et CCR5), CCL5 active la voie de l'AMP cyclique, ce qui polarise la cellule entraînant la translocation de NFκB, l'augmentation de la capacité des macrophages à la phagocytose, la survie cellulaire et la transcription des gènes pro-inflammatoires. Le complexe formé par le CCL5 et son récepteur peut aussi être internalisé par la cellule *via* les clathrines puis recyclé ou dégradé par les organelles et vacuoles cytoplasmiques, régulant ainsi l'expression des récepteurs du CCL5 à la surface cellulaire (289,290). De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont associé CCL5 à la sévérité de certaines infections virales (220). Le virus respiratoire syncytial (VRS) est la cause la plus fréquente d'infection respiratoire des jeunes enfants, entraînant l'obstruction des poumons et un asthme bronchique. Les enfants infectés au VRS ont un taux élevé de CCL5 dans les sécrétions pulmonaires qui est corrélé positivement à la sévérité de la maladie (291). Dans un modèle d'infection au RSV chez la souris, l'élévation du taux de CCL5 dans le lavage broncho-alvéolaire se fait en deux phases : une première phase induite par la réponse immunitaire des cellules pulmonaires résidentes, et une deuxième phase (après 7 jours) dérivant des lymphocytes T (292). L'utilisation de Met-RANTES, un inhibiteur fonctionnel de CCL5, diminue le taux de CCL5 dans le lavage broncho-alvéolaire et réduit l'immunopathologie de la maladie mais seulement si l'inhibition est réalisée dans la deuxième

phase. En effet, le blocage de CCL5 pendant la première phase donne l'effet contraire (292). Ainsi, dans l'infection virale, CCL5 peut protéger l'hôte dans les phases précoces de l'infection mais par contre, par la suite il contribue à la physiopathologie de la maladie par l'induction d'influx cellulaire responsable des dommages tissulaires.

A l'inverse, d'autres études ont montré un effet anti-inflammatoire de CCL5. L'incubation des cellules mononuclées sanguines avec le CCL5 diminue la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 induites par le LPS (293), ainsi que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par l'ATP par les monocytes (294). En clinique, il a été montré que le CCL5 était la seule cytokine corrélée négativement avec le score APACHE II dans le sepsis, et qu'un taux plasmatique faible de CCL5 était significativement un marqueur de mauvais pronostic (222). Chez les patients avec une septicémie à méningocoques, les chimiokines MCP-1, MIP1 $\alpha$  et IL-8 sont corrélées positivement au taux plasmatique de LPS, tandis qu'une corrélation négative est observée avec le taux de CCL5 (295). Curieusement, l'incubation du *Neisseria meningitidis* en sang total induit la sécrétion de toutes ces chimiokines (295). Il a aussi été montré qu'un taux plasmatique faible de CCL5 est un marqueur indépendant de la mortalité cardiaque (296).

Ainsi, en fonction du contexte, CCL5 peut être associé à un contexte inflammatoire, ou inversement être anti-inflammatoire. Nous avons donc recherché, si dans le modèle en sang total, le CCL5 exerçait un effet anti- ou pro-inflammatoire. Un effet inhibiteur faible mais significatif sur la sécrétion des cytokines a été observé en présence de CCL5 (résultats non montrés). Cela contraste avec les études précédemment citées, qui montraient un effet activateur du Nf $\kappa$ B par le CCL5 et ainsi la sécrétion d'IL-6 et du TNF- $\alpha$ , mais ces études ont été réalisées avec des cellules isolées. De ce fait, la différence de modèle cellulaire peut expliquer cette différence de résultats, justifiant notre choix d'avoir travaillé en sang total. Les lymphocytes sont une des principales sources de CCL5 (Cf RANTES pour *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted*) et il a été montré que les monocytes sont indispensables pour la sécrétion de CCL5 par les lymphocytes CD4<sup>+</sup> en présence de phytohémagglutinine ou du TNF- $\alpha$  (297,298). Si l'effet anti-inflammatoire du ZPI nécessite la sécrétion de CCL5, cela expliquerait l'absence d'effet inhibiteur de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires du ZPI sur les monocytes isolés stimulés par le LPS, ainsi que la nécessité d'une coopération cellulaire entre les monocytes et les lymphocytes. Ce mécanisme implique l'activation de la voie p38-MAPK qui augmente la sécrétion d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (293). Toutefois la sécrétion d'IL-10 n'a pu être étudiée dans notre modèle en sang total, les quantités d'IL-10 produites étant trop faibles.

La coopération lymphocytes/monocytes est indispensable pour l'effet anti-inflammatoire du ZPI. Si on peut envisager cette coopération *via* un médiateur soluble comme CCL5, il a aussi été montré que les lymphocytes amplifient la production de cytokines pro-inflammatoires par un contact cellulaire direct entre les lymphocytes T et les monocytes (299). Plusieurs études ont cherché à identifier les molécules de surface nécessaires à cette interaction, montrant par exemple l'implication du *leukocyte function antigen (LFA)-1/intercellular adhesion molecule (ICAM)-1* ou du CD40/CD40L. L'expression de LFA-1 et du CD69 à la surface des lymphocytes activés (par du phytohémagglutinine A/phorbol myristate acétate, PHA/PMA) contribue à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les monocytes (300,301). De même, les lymphocytes T activés, isolés du liquide synovial des patients ayant une arthrite rhumatoïde ou activés par l'IL-15, stimulent la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages, et l'effet est inhibé par les anticorps anti-LFA-1, anti-CD69 ou anti-ICAM-1 (302). Ribbens et coll. ont montré que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les monocytes, induite par les lymphocytes T activés par l'IL-15, passait en partie par la liaison CD40/CD40L (303). L'effet anti-inflammatoire du ZPI pourrait donc passer par l'inhibition d'un contact direct entre les lymphocytes et les monocytes, en se liant par une de ces molécules de surface précédemment citées. D'autant plus que dans des expériences préliminaires en cytométrie en flux, j'ai constaté la fixation du ZPI à la surface des monocytes et plus faiblement aux lymphocytes (résultats non montrés).

L'effet anti-inflammatoire du ZPI pourrait aussi passer par d'autres mécanismes si on se réfère à l'alpha-1 antitrypsine. L'AAT est une protéine de la superfamille des serpins comme le ZPI, et est aussi une protéine de l'inflammation (304). De nombreuses études ont montré l'effet anti-inflammatoire et anti-apoptotique de l'AAT, dont les mécanismes moléculaires ne sont pas encore complètement élucidés, mais qui, de façon similaire au ZPI, impliqueraient en partie sa boucle réactive (305). De manière dépendante de sa boucle réactive, l'AAT en se fixant au récepteur des complexes serpine-enzyme induit une sécrétion d'IL-1 récepteur antagoniste (IL-1Ra) par les cellules mononucléées sanguines. Toutefois, nous n'avons pas détecté de sécrétion accrue d'IL-1Ra avec notre puce protéique en présence de ZPI. De façon intéressante, une inhibition du *tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (TACE)* par l'AAT a aussi été observée, même si ce n'est pas une sérine-protéase. Comme pour le ZPI, d'autres études ont montré que l'AAT pourrait avoir un effet anti-inflammatoire par un mécanisme ne nécessitant pas sa boucle réactive, car une forme inactivée d'AAT peut inhiber la sécrétion du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ , et augmenter la sécrétion d'IL-10 par des monocytes stimulés par le LPS (306), mais aucun mécanisme moléculaire n'a été décrit pour expliquer cette observation.

L'effet anti-inflammatoire du ZPI que nous avons mis en évidence pourrait expliquer le résultat de certaines études cliniques. Il est maintenant largement admis que l'athérosclérose est une pathologie inflammatoire (307). Sofi et coll. ont montré une corrélation entre un taux plasmatique faible de PZ et ZPI et la sévérité de l'athérosclérose chez 95 patients (106). C'est, à notre connaissance, la seule étude qui a observé le taux plasmatique de ZPI dans les maladies thrombotiques artérielles. Par contre, de nombreux travaux ont suggéré un lien entre taux plasmatique de PZ et pathologie ischémique artérielle, sans que l'on puisse comprendre le lien. Comme il existe une corrélation entre taux plasmatique de ZPI et PZ, le ZPI ayant des propriétés anti-inflammatoires, il est possible que ce soit la diminution de ZPI associée au déficit en PZ qui soit un facteur de risque de thrombose artérielle, le déficit en ZPI ne permettant pas d'inhiber les mécanismes inflammatoires présents au niveau des lésions athéromateuses. Cette hypothèse semble corroborée par les travaux de Butschkau et coll., qui ont observé une prolifération plus importante de la néointima après lésion de la carotide par le chlorure ferrique chez des souris déficitaires en PZ que chez les souris témoins (308). Il est à noter que chez la souris, il semble davantage que ce soit la PZ plutôt que le ZPI qui ait des propriétés immunomodulatrices. Ainsi, ce sont chez les souris déficitaires en PZ que l'on observe des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires quand elles sont soumises à une inflammation systémique (268). Il faut noter également que chez la souris, c'est la PZ qui est en excès dans le plasma, contrairement à l'Homme. Quoiqu'il en soit, ces données, aussi bien chez l'Homme que chez la souris, semble indiquer une relation entre le système PZ/ZPI et l'inflammation, au niveau systémique ou au niveau local.

Concernant la régulation locale de l'inflammation, on peut aussi envisager que la production de ZPI par les cellules cancéreuses est un moyen pour les cellules tumorales d'échapper au système immunitaire. En effet, il a été mis en évidence des ARNm de PZ et ZPI dans les cellules cancéreuses, indiquant une production localisée de ces deux protéines ainsi que la présence de PZ et ZPI sur les macrophages associés aux tumeurs (TAMs). En revanche, il n'a pas été observé d'ARNm de ZPI ni de PZ dans les TAMs, ce qui laisse à supposer qu'ils proviennent du tissu tumoral. Il est donc possible que la sécrétion de ZPI par les cellules cancéreuses soit un moyen d'échapper aux défenses de l'organisme, en atténuant l'inflammation nécessaire à l'activation du système immunitaire.

Ce possible contrôle local de l'inflammation par le ZPI laisse à penser qu'il faudrait peut-être envisager le dosage du ZPI dans d'autres pathologies que la pathologie thrombotique. Il a par exemple été montré que la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une

maladie inflammatoire chronique des bronches pouvant conduire à l'emphysème pulmonaire. C'est la quatrième cause de décès au niveau mondial et l'obstruction ventilatoire est significativement corrélée à une exposition chronique à des particules nocives, des gaz ou particulièrement la fumée de cigarette (309). Cependant, dans une population tabagique, seule 15-20 % sont victimes d'une atteinte emphysemateuse clinique, suggérant d'autres facteurs génétiques ou environnementaux (310). Un déficit en AAT a été associé au développement d'emphysème pulmonaire dont le risque augmente chez un fumeur (311,312). Au vu de nos résultats, on peut se demander si un déficit en ZPI pourrait constituer un facteur de risque de développer un emphysème pulmonaire chez les patients avec une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO).

La deuxième partie de ce travail a montré que l'élastase neutrophile (EN) à la surface des NETs peut entraîner la perte de l'activité anticoagulante du ZPI, cette inactivation résulte d'un clivage au sein de la boucle réactive du ZPI où des sites potentiels de clivage par l'EN sont présents. Deux autres sites de clivages successifs sont observés conduisant à un peptide de 56 kDa, puis réduit à 43 kDa. Nous avons analysé le profil électrophorétique du ZPI chez quelques patients en choc septique, l'augmentation mise en évidence avec un dosage immunoenzymatique par rapport aux témoins sains est représentée par une intensité plus importante de la bande correspondant au ZPI. Cependant, aucun des patients analysés ne présentait un ZPI clivé ayant une masse moléculaire de 56 ou 43 kDa. Ceci n'est pas surprenant, car l'élastase neutrophile est neutralisée par l'AAT (313). Par contre, l'apparition d'une bande de plus faible poids moléculaire à environ 68 kDa est remarquée chez certains patients, traduisant probablement le clivage du ZPI au niveau de sa boucle réactive. Ce clivage résulte donc de la liaison du ZPI avec les FXa ou FXIa, ou bien d'un clivage par l'EN entraînant une perte de l'activité anticoagulante du ZPI. Sachant que le taux plasmatique de l'AAT, le principal inhibiteur de l'EN, est augmenté au cours de l'inflammation, et qu'aucune des deux formes clivées du ZPI induits par l'EN n'est observée, il est plus probable que cette forme de ZPI résulte de sa liaison avec le FXa ou le FXIa. Quoiqu'il en soit, ces observations montrent que le système PZ/ZPI est activé chez certains patients au cours du choc septique. Ce clivage n'est pas observé chez tous les patients, il sera intéressant d'analyser si le complexe PZ/ZPI est sollicité par exemple chez des patients ayant une diminution importante d'AT, auquel cas le système PZ/ZPI constituerait une « seconde ligne » pour empêcher l'activation de la coagulation, ou bien si c'est simplement le reflet de l'activation de la phase contact par certains germes.

La coagulation étant un moyen de défense de l'organisme (cf immunothrombose) en plus de l'immunité innée au cours de l'inflammation systémique initiée par un pathogène, la neutralisation du ZPI de manière localisée permet ainsi la formation d'un réseau de fibrines, conduisant à un caillot et limitant la propagation du pathogène.

Nous avons observé que l'élastase neutrophile induit un rapide clivage du ZPI au niveau de sa boucle réactive. Comme un variant de ZPI muté sur le site actif garde une bonne partie de son activité anti-inflammatoire, on peut supposer que le premier clivage rapide du ZPI par les NETs n'annule pas son effet anti-inflammatoire, sauf si ce clivage s'accompagne d'une déstructuration importante du ZPI clivé. En revanche, nous ignorons si les deux peptides de plus petite masse moléculaire issus du ZPI après les clivages plus tardifs gardent ou non leur effet anti-inflammatoire. Cette information nous permettrait de déterminer si l'extrémité amino-terminale du ZPI qui est clivée par l'élastase neutrophile est cruciale pour l'activité anti-inflammatoire du ZPI et permettrait de mieux comprendre la relation structure-fonction du ZPI.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons donc étudié les variations des taux de PZ et de ZPI au cours du choc septique. Nous avons ainsi observé que le taux de PZ était significativement diminué dans les premières heures qui suivent le choc septique. Cette diminution peut être due soit à un défaut de synthèse, associé à une éventuelle défaillance hépatique, soit à une consommation accrue, indiquant alors que le complexe PZ/ZPI est effectivement impliqué dans la défense antithrombotique au cours du choc septique. Inversement, le taux de ZPI est significativement augmenté, indiquant que sa synthèse est supérieure à son éventuelle consommation. Cependant, malgré ces taux élevés de ZPI, nous n'avons pas pu montrer que les patients qui avaient les taux les plus élevés de ZPI avaient une survie supérieure aux autres patients. Cependant il faut souligner qu'*in vitro*, il fallait des taux d'au moins 500 % de ZPI pour avoir un effet inhibiteur sur la production de cytokines pro-inflammatoires. Peu de patients ont atteint ces taux. De même chez la souris, il a fallu administrer des doses élevées de ZPI pour diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires. En fait, nous avons administré à la souris du ZPI recombinant humain et nous avons observé que le rhZPI avait une demi-vie courte, même en absence d'injection de LPS (< 10 % dans le plasma 1 heure après l'administration). Par conséquent, il est nécessaire de disposer de ZPI recombinant murin (rmZPI), pour voir si le rmZPI exerce aussi une activité anti-inflammatoire chez la souris (nous avons vu que c'est peut-être la PZ murine qui a des

propriétés immunomodulatrices) et s'il existe un turn-over accéléré de ZPI au cours du choc septique expérimental.

Les propriétés anti-inflammatoires que nous avons mises en évidence associées à son activité anticoagulante du ZPI le rendent comme un candidat potentiellement intéressant dans diverses situations pathologiques où co-existent à la fois un état inflammatoire et une activation excessive de la coagulation. Une pathologie très fréquente est la survenue des accidents vasculaires cérébraux ischémiques. L'utilisation d'héparine à la phase aigüe est délicate, car elle surexpose à un risque hémorragique. De plus, la réaction inflammatoire qui fait suite à la revascularisation est associée à un plus mauvais pronostic et il semble important de disposer de nouvelles stratégies permettant de limiter l'inflammation (314). Le ZPI pourrait donc peut-être constituer une nouvelle stratégie thérapeutique dans ce contexte.

Des études cliniques sont actuellement en cours pour évaluer l'intérêt thérapeutique de l'AAT dans la transplantation d'organes comme les îlots pancréatiques ou les poumons (315). Car l'AAT a été montrée comme inhibant la mort cellulaire et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle d'ischémie-reperfusion au cours d'une transplantation pulmonaire chez le rat (316). De même l'AAT diminue l'inflammation et améliore la survie des souris transplantées par des îlots pancréatiques (317). Comme le ZPI diminue aussi l'inflammation et présente l'avantage d'avoir en même temps des effets anticoagulants, puisque la première cause de la perte précoce du greffon est la thrombose veineuse dans la greffe du pancréas (6 à 20 % des cas) (318), l'utilisation du ZPI dans les transplantations pourrait être envisagé.

De même, dans le myélome multiple, il existe une production importante d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par les cellules myélomateuses, ainsi qu'une production accrue de MIP-1 $\alpha$  qui constitue un critère de mauvais pronostic (319). De plus, le risque thromboembolique est accru chez ces patients, notamment en raison de l'utilisation de la thalidomide (320). On peut donc envisager que l'administration de ZPI pourrait constituer un traitement prophylactique de la thrombose veineuse, et sa capacité à diminuer la sécrétion de MIP-1 $\alpha$  pourrait participer à la limitation des lésions osseuses.

Enfin, le ZPI pourrait constituer un traitement de choix du choc septique. En effet, contrairement aux médicaments immunomodulateurs testés jusqu'à présent comme les anticorps ciblant le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1, qui ciblaient uniquement une cytokine et inhibaient complètement son effet, le ZPI diminue le taux plasmatique d'un ensemble de cytokines (IL-

6,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  et  $\text{MIP-1}$ ). Il est important de souligner que contrairement à ce qui est obtenu avec les anticorps monoclonaux, il persiste encore une production de ces cytokines pro-inflammatoires, qui sont nécessaires pour aider l'organisme à lutter contre les infections. Enfin, le ZPI (en absence de PZ) n'inhibe que le  $\text{FXIa}$ , dont l'inhibition permet d'avoir un effet anticoagulant avec un risque hémorragique faible. Le ZPI pourrait donc atténuer la réponse inflammatoire excessive observée chez les patients en choc septique et en même temps, prévenir l'apparition de CIVD et éviter le saignement des patients, principal effet indésirable des autres inhibiteurs physiologiques de la coagulation étudiés dans le choc septique.



## **Bibliographie**

1. Yoshida T, Souri M, Osaki T, Saito S, Meijers JCM, Kurachi H, et al. The plasma levels of protein Z-dependent protease inhibitor increase after gynecological surgery independently of estrogen. *Thromb Res.* nov 2015;136(5):980- 6.
2. Doat S, Borgel D, François J-H, Bianchini E, Botton J, François D, et al. Unbalance between plasma levels of Protein Z and protein Z-dependent inhibitor in patients with colorectal and pancreatic cancer: A pilot study. *Thromb Res.* févr 2014;133(2):299- 300.
3. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 11 févr 1999;340(6):448- 54.
4. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* janv 2013;13(1):34- 45.
5. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res.* mars 2012;129(3):220- 4.
6. Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(4):326- 36.
7. Stavrou E, Schmaier AH. Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res.* mars 2010;125(3):210- 5.
8. Björkqvist J, Nickel KF, Stavrou E, Renné T. In vivo activation and functions of the protease factor XII. *Thromb Haemost.* nov 2014;112(5):868- 75.
9. Weidmann H, Heikaus L, Long AT, Naudin C, Schlüter H, Renné T. The plasma contact system, a protease cascade at the nexus of inflammation, coagulation and immunity. *Biochim Biophys Acta.* nov 2017;1864(11 Pt B):2118- 27.
10. Mohammed BM, Matafonov A, Ivanov I, Sun M-F, Cheng Q, Dickeson SK, et al. An update on factor XI structure and function. *Thromb Res.* 2018;161:94- 105.
11. Bane CE, Ivanov I, Matafonov A, Boyd KL, Cheng Q, Sherwood ER, et al. Factor XI Deficiency Alters the Cytokine Response and Activation of Contact Proteases during Polymicrobial Sepsis in Mice. *PLoS One.* 2016;11(4):e0152968.
12. Pathak M, Kaira BG, Slater A, Emsley J. Cell Receptor and Cofactor Interactions of the Contact Activation System and Factor XI. *Front Med.* 2018;5:66.
13. Thompson RE, Mandle R, Kaplan AP. Studies of binding of prekallikrein and Factor XI to high molecular weight kininogen and its light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* oct 1979;76(10):4862- 6.
14. Naudin C, Burillo E, Blankenberg S, Butler L, Renné T. Factor XII Contact Activation. *Semin Thromb Hemost.* nov 2017;43(8):814- 26.
15. Joseph K, Shibayama Y, Ghebrehiwet B, Kaplan AP. Factor XII-dependent contact activation on endothelial cells and binding proteins gC1qR and cytokeratin 1. *Thromb Haemost.* janv 2001;85(1):119- 24.

16. Pixley RA, Espinola RG, Ghebrehiwet B, Joseph K, Kao A, Bdeir K, et al. Interaction of high-molecular-weight kininogen with endothelial cell binding proteins suPAR, gC1qR and cytokeratin 1 determined by surface plasmon resonance (BiaCore). *Thromb Haemost.* juin 2011;105(6):1053- 9.
17. Couture R, Blaes N, Girolami J-P. Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr Vasc Pharmacol.* mars 2014;12(2):223- 48.
18. Maas C, Renné T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation. *Blood.* 26 févr 2018;
19. White-Adams TC, Berny MA, Tucker EI, Gertz JM, Gailani D, Urbanus RT, et al. Identification of coagulation factor XI as a ligand for platelet apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* oct 2009;29(10):1602- 7.
20. Ottaiano TF, Andrade SS, de Oliveira C, Silva MCC, Buri MV, Juliano MA, et al. Plasma kallikrein enhances platelet aggregation response by subthreshold doses of ADP. *Biochimie.* avr 2017;135:72- 81.
21. Morrissey JH, Smith SA. Polyphosphate as modulator of hemostasis, thrombosis, and inflammation. *J Thromb Haemost JTH.* juin 2015;13 Suppl 1:S92-97.
22. Henderson LM, Figueroa CD, Müller-Esterl W, Bhoola KD. Assembly of contact-phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. *Blood.* 15 juill 1994;84(2):474- 82.
23. Renné T, Schmaier AH, Nickel KF, Blombäck M, Maas C. In vivo roles of factor XII. *Blood.* 22 nov 2012;120(22):4296- 303.
24. Monroe DM, Key NS. The tissue factor–factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost.* 1 juin 2007;5(6):1097- 105.
25. Maroney SA, Ellery PE, Mast AE. Alternatively spliced isoforms of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res.* avr 2010;125 Suppl 1:S52-56.
26. Mast AE. Tissue Factor Pathway Inhibitor: Multiple Anticoagulant Activities for a Single Protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* janv 2016;36(1):9- 14.
27. Broze GJ, Girard TJ. Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. *Front Biosci Landmark Ed.* 1 janv 2012;17:262- 80.
28. Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol.* avr 2012;95(4):333- 45.
29. Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, et al. Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature.* 30 mars 2000;404(6777):518- 25.
30. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 sept 1996;93(19):10212- 6.
31. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2005;25(7):1311- 20.

32. Conard J, Brosstad F, Lie Larsen M, Samama M, Abildgaard U. Molar antithrombin concentration in normal human plasma. *Haemostasis*. 1983;13(6):363- 8.
33. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost JTH*. juill 2007;5 Suppl 1:102- 15.
34. Mammen EF. Antithrombin: its physiological importance and role in DIC. *Semin Thromb Hemost*. 1998;24(1):19- 25.
35. Dedio J, Jahnen-Dechent W, Bachmann M, Müller-Esterl W. The multiligand-binding protein gC1qR, putative C1q receptor, is a mitochondrial protein. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 avr 1998;160(7):3534- 42.
36. van Leeuwen HC, O'Hare P. Retargeting of the mitochondrial protein p32/gC1qR to a cytoplasmic compartment and the cell surface. *J Cell Sci*. juin 2001;114(Pt 11):2115- 23.
37. Ghebrehiwet B, CebadaMora C, Tantral L, Jesty J, Peerschke EIB. gC1qR/p33 serves as a molecular bridge between the complement and contact activation systems and is an important catalyst in inflammation. *Adv Exp Med Biol*. 2006;586:95- 105.
38. Guo WX, Ghebrehiwet B, Weksler B, Schweitzer K, Peerschke EI. Up-regulation of endothelial cell binding proteins/receptors for complement component C1q by inflammatory cytokines. *J Lab Clin Med*. juin 1999;133(6):541- 50.
39. Reddigari SR, Shibayama Y, Brunnée T, Kaplan AP. Human Hageman factor (factor XII) and high molecular weight kininogen compete for the same binding site on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem*. 5 juin 1993;268(16):11982- 7.
40. Mahdi F, Madar ZS, Figueroa CD, Schmaier AH. Factor XII interacts with the multiprotein assembly of urokinase plasminogen activator receptor, gC1qR, and cytokeratin 1 on endothelial cell membranes. *Blood*. 15 mai 2002;99(10):3585- 96.
41. Zeerleder S. C1-inhibitor: more than a serine protease inhibitor. *Semin Thromb Hemost*. juin 2011;37(4):362- 74.
42. Broze GJ, Miletich JP. Human Protein Z. *J Clin Invest*. avr 1984;73(4):933- 8.
43. Fujimaki K, Yamazaki T, Taniwaki M, Ichinose A. The gene for human protein Z is localized to chromosome 13 at band q34 and is coded by eight regular exons and one alternative exon. *Biochemistry*. 12 mai 1998;37(19):6838- 46.
44. Rice GI, Futers TS, Grant PJ. Identification of novel polymorphisms within the protein Z gene, haplotype distribution and linkage analysis. *Thromb Haemost*. juin 2001;85(6):1123- 4.
45. Ichinose A, Takeya H, Espling E, Iwanaga S, Kisiel W, Davie EW. Amino acid sequence of human protein Z, a vitamin K-dependent plasma glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. 15 nov 1990;172(3):1139- 44.
46. Hogg PJ, Stenflo J. Interaction of human protein Z with thrombin: evaluation of the species difference in the interaction between bovine and human protein Z and thrombin. *Biochem Biophys Res Commun*. 15 août 1991;178(3):801- 7.

47. Miletich JP, Broze GJ. Human plasma protein Z antigen: range in normal subjects and effect of warfarin therapy. *Blood*. juin 1987;69(6):1580- 6.
48. Sejima H, Hayashi T, Deyashiki Y, Nishioka J, Suzuki K. Primary structure of vitamin K-dependent human protein Z. *Biochem Biophys Res Commun*. 14 sept 1990;171(2):661- 8.
49. Almawi WY, Al-Shaikh FS, Melemedjian OK, Almawi AW. Protein Z, an anticoagulant protein with expanding role in reproductive biology. *Reproduction*. 8 janv 2013;146(2):R73- 80.
50. Souri M, Koseki-Kuno S, Iwata H, Kemkes-Matthes B, Ichinose A. A naturally occurring E30Q mutation in the Gla domain of protein Z causes its impaired secretion and subsequent deficiency. *Blood*. 15 avr 2005;105(8):3149- 54.
51. Iwata H, Souri M, Kemkes-Matthes B, Ichinose A. An additional Glu30Lys substitution in the Gla domain of the protein Z gene is not a common polymorphism but a rare mutation, which would cause its deficiency. *J Thromb Haemost JTH*. oct 2005;3(10):2360- 1.
52. Souri M, Iwata H, Zhang WG, Ichinose A. Unique secretion mode of human protein Z: its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion. *Blood*. 16 avr 2009;113(16):3857- 64.
53. Kemkes-Matthes B, Matthes KJ. Protein Z, a new haemostatic factor, in liver diseases. *Haemostasis*. déc 1995;25(6):312- 6.
54. Greten J, Kreis I, Liliensiek B, Allenberg J, Amiral J, Ziegler R, et al. Localisation of protein Z in vascular lesions of patients with atherosclerosis. *VASA Z Gefasskrankheiten*. août 1998;27(3):144- 8.
55. Vasse M, Denoyelle C, Corbière C, Litzler P-Y, Legrand E, Vannier J-P. Human endothelial cells synthesize protein Z, but not the protein Z dependent inhibitor. *Thromb Haemost*. mars 2006;95(3):519- 23.
56. Han X, Fiehler R, Broze GJ. Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 août 1998;95(16):9250- 5.
57. Han X, Huang Z-F, Fiehler R, Broze GJ. The Protein Z-Dependent Protease Inhibitor Is a Serpin. *Biochemistry*. 1 août 1999;38(34):11073- 8.
58. Van de Water N, Tan T, Ashton F, O'Grady A, Day T, Browett P, et al. Mutations within the protein Z-dependent protease inhibitor gene are associated with venous thromboembolic disease: a new form of thrombophilia. *Br J Haematol*. 1 oct 2004;127(2):190- 4.
59. Corral J, González-Conejero R, Soria JM, González-Porrás JR, Pérez-Ceballos E, Lecumberri R, et al. A nonsense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. *Blood*. 1 juill 2006;108(1):177- 83.
60. Dentali F, Gianni M, Lussana F, Squizzato A, Cattaneo M, Ageno W. Polymorphisms of the Z protein protease inhibitor and risk of venous thromboembolism: a meta-analysis. *Br J Haematol*. oct 2008;143(2):284- 7.
61. Wei Z, Yan Y, Carrell RW, Zhou A. Crystal structure of protein Z-dependent inhibitor complex shows how protein Z functions as a cofactor in the membrane inhibition of factor X. *Blood*. 22 oct 2009;114(17):3662- 7.

62. Han X, Fiehler R, Broze GJ. Characterization of the protein Z–dependent protease inhibitor. *Blood*. 1 nov 2000;96(9):3049- 55.
63. New L, Liu K, Kamali V, Plowman G, Naughton BA, Purchio AF. cDNA cloning of rasp-1, a novel gene encoding a plasma protein associated with liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 14 juin 1996;223(2):404- 12.
64. Sengupta T, Manoj N. Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Bind to Protein Z Cooperatively and with Equal Affinity. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161896.
65. Gettins PGW. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev*. déc 2002;102(12):4751- 804.
66. Huang X, Swanson R, Broze GJ, Olson ST. Kinetic characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor reaction with blood coagulation factor Xa. *J Biol Chem*. 31 oct 2008;283(44):29770- 83.
67. Huang X, Dementiev A, Olson ST, Gettins PGW. Basis for the specificity and activation of the serpin protein Z-dependent proteinase inhibitor (ZPI) as an inhibitor of membrane-associated factor Xa. *J Biol Chem*. 25 juin 2010;285(26):20399- 409.
68. Olson ST, Swanson R, Raub-Segall E, Bedsted T, Sadri M, Petitou M, et al. Accelerating ability of synthetic oligosaccharides on antithrombin inhibition of proteinases of the clotting and fibrinolytic systems. Comparison with heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost*. nov 2004;92(5):929- 39.
69. Huntington JA. Natural inhibitors of thrombin. *Thromb Haemost*. 1 avr 2014;111(4):583- 9.
70. Huang X, Rezaie AR, Broze GJ, Olson ST. Heparin is a major activator of the anticoagulant serpin, protein Z-dependent protease inhibitor. *J Biol Chem*. 18 mars 2011;286(11):8740- 51.
71. Yang L, Ding Q, Huang X, Olson ST, Rezaie AR. Characterization of the heparin-binding site of the protein z-dependent protease inhibitor. *Biochemistry*. 15 mai 2012;51(19):4078- 85.
72. Vasse M. The protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor complex. Systemic or local control of coagulation? *Hamostaseologie*. août 2011;31(3):155- 8, 160- 4.
73. Huang X, Liu B, Wei Y, Beyea R, Yan H, Olson ST. Lipid oxidation inactivates the anticoagulant function of protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI). *J Biol Chem*. 01 2017;292(35):14625- 35.
74. Rezaie AR, Sun M, Gailani D. Contributions of basic amino acids in the autolysis loop of factor XIa to serpin specificity. *Biochemistry*. 8 août 2006;45(31):9427- 33.
75. Heeb MJ, Cabral KM, Ruan L. Down-regulation of factor IXa in the factor Xase complex by protein Z-dependent protease inhibitor. *J Biol Chem*. 7 oct 2005;280(40):33819- 25.
76. Yang L, Rezaie AR. Residues of the 39-loop restrict the plasma inhibitor specificity of factor IXa. *J Biol Chem*. 3 mai 2013;288(18):12692- 8.
77. Yang L, Rezaie AR. Characterization of Protein Z-Dependent Protease Inhibitor/Antithrombin Chimeras Provides Insight into the Serpin Specificity of Coagulation Proteases. *ACS Omega*. 31 juill 2017;2(7):3276- 83.

78. Tabatabai A, Fiehler R, Broze GJ. Protein Z circulates in plasma in a complex with protein Z-dependent protease inhibitor. *Thromb Haemost. avr* 2001;85(4):655- 60.
79. Girard TJ, Lasky NM, Tuley EA, Broze GJ. Protein Z, Protein Z-Dependent Protease Inhibitor (SerpinA10) and the Acute Phase Response. *J Thromb Haemost JTH. févr* 2013;11(2):375- 8.
80. Huang X, Yan Y, Tu Y, Gatti J, Broze GJ, Zhou A, et al. Structural basis for catalytic activation of protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) by protein Z. *Blood. 23 août* 2012;120(8):1726- 33.
81. Zhang J, Tu Y, Lu L, Lasky N, Broze GJ. Protein Z-dependent protease inhibitor deficiency produces a more severe murine phenotype than protein Z deficiency. *Blood. 15 mai* 2008;111(10):4973- 8.
82. Yin ZF, Huang ZF, Cui J, Fiehler R, Lasky N, Ginsburg D, et al. Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A. 6 juin* 2000;97(12):6734- 8.
83. Refaai MA, Ahn C, Lu L, Wu K, Broze GJ. Protein Z and ZPI levels and cardiovascular events. *J Thromb Haemost JTH. juill* 2006;4(7):1628- 9.
84. Heeb MJ, Fisher M, Paganini-Hill A. Association of low protein Z levels with ischemic stroke in young women. *Thromb Haemost. mars* 2007;97(3):495- 6.
85. McQuillan AM, Eikelboom JW, Hankey GJ, Baker R, Thom J, Staton J, et al. Protein Z in ischemic stroke and its etiologic subtypes. *Stroke. oct* 2003;34(10):2415- 9.
86. Steffano B, Forastiero R, Martinuzzo M, Kordich L. Low plasma protein Z levels in patients with antiphospholipid antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb. juill* 2001;12(5):411- 2.
87. Vasse M, Guegan-Massardier E, Borg JY, Woimant F, Soria C. Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. *Lancet Lond Engl. 24 mars* 2001;357(9260):933- 4.
88. Kobelt K, Biasiutti FD, Mattle HP, Lämmle B, Wuillemin WA. Protein Z in ischaemic stroke. *Br J Haematol. juill* 2001;114(1):169- 73.
89. Cesari F, Fatini C, Sticchi E, Fedi S, Abbate R, Gensini GF, et al. Protein Z gene polymorphisms (intron F 79 G>A; -13 A>G) are not associated with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost. juill* 2006;96(1):98- 9.
90. Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski H, Czlonkowska A, Kuczynska-Zardzewialy A. Protein Z in young survivors of ischemic stroke. *Thromb Haemost. sept* 2002;88(3):536.
91. Pardos-Gea J, Ordi-Ros J, Serrano S, Balada E, Nicolau I, Vilardell M. Protein Z levels and anti-protein Z antibodies in patients with arterial and venous thrombosis. *Thromb Res. 2008;121(6):727- 34.*
92. Oztürk MA, Ozbalkan Z, Onat AM, Ertenli I, Kiraz S, Aytemir K, et al. Decreased protein Z concentrations complicating the hypercoagulable state of Behçet's disease. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb. juill* 2003;9(3):259- 63.
93. Hinterleitner C, Kreisselmeier K-P, Pecher A-C, Mauz P-S, Kanz L, Kopp H-G, et al. Low plasma protein Z levels are associated with an increased risk for perioperative bleedings. *Eur J Haematol. mai* 2018;100(5):403- 11.

94. Santacroce R, Cappucci F, Di Perna P, Sessa F, Margaglione M. Protein Z gene polymorphisms are associated with protein Z plasma levels. *J Thromb Haemost JTH*. juill 2004;2(7):1197- 9.
95. Ravi S, Mauron T, Lämmle B, Wuillemin WA. Protein Z in healthy human individuals and in patients with a bleeding tendency. *Br J Haematol*. sept 1998;102(5):1219- 23.
96. Fedi S, Sofi F, Brogi D, Tellini I, Cesari F, Sestini I, et al. Low protein Z plasma levels are independently associated with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost*. déc 2003;90(6):1173- 8.
97. Yurdakök M, Gürakan B, Ozbağ E, Viğit S, DüNDAR S, Kirazli S. Plasma protein Z levels in healthy newborn infants. *Am J Hematol*. mars 1995;48(3):206- 7.
98. Schettini F, Laforgia N, Altomare M, Mautone A, Del Vecchio GC. Plasma protein Z levels in healthy and high-risk newborn infants. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. mai 2004;93(5):654- 8.
99. Fedi S, Sofi F, Brogi D, Tellini I, Cesari F, Sestini I, et al. Low protein Z plasma levels are independently associated with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost*. déc 2003;90(6):1173- 8.
100. Al-Shanqeeti A, van Hylckama Vlieg A, Berntorp E, Rosendaal FR, Broze GJ. Protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor. Determinants of levels and risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost*. mars 2005;93(3):411- 3.
101. Gamba G, Bertolino G, Montani N, Spedini P, Balduini CL. Bleeding tendency of unknown origin and protein Z levels. *Thromb Res*. 15 juin 1998;90(6):291- 5.
102. Thommen D, Sulzer I, Buhrfeind E, Naef R, Furlan M, Lämmle B. [Measurement of bleeding time and study of thrombocyte aggregation. Standardization of methods, normal values and results in patients with suspected hemorrhagic diathesis]. *Schweiz Med Wochenschr*. 29 oct 1988;118(43):1559- 67.
103. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Broze G, Fedi S. A meta-analysis of potential risks of low levels of protein Z for diseases related to vascular thrombosis. *Thromb Haemost*. avr 2010;103(4):749- 56.
104. Zhang L, Segal AZ, Leifer D, Silverstein RL, Gerber LM, Devereux RB, et al. Circulating protein Z concentration, PROZ variants, and unexplained cerebral infarction in young and middle-aged adults. *Thromb Haemost*. 05 2017;117(1):149- 57.
105. Jensen SB, Hindberg K, Solomon T, Smith EN, Lapek JD, Gonzalez DJ, et al. Discovery of novel plasma biomarkers for future incident venous thromboembolism by untargeted synchronous precursor selection mass spectrometry proteomics. *J Thromb Haemost JTH*. sept 2018;16(9):1763- 74.
106. Sofi F, Cesari F, Tu Y, Pratesi G, Pulli R, Pratesi C, et al. Protein Z-dependent protease inhibitor and protein Z in peripheral arterial disease patients. *J Thromb Haemost JTH*. mai 2009;7(5):731- 5.
107. Souri M, Sugiura-Ogasawara M, Saito S, Kemkes-Matthes B, Meijers JCM, Ichinose A. Increase in the plasma levels of protein Z-dependent protease inhibitor in normal pregnancies but not in non-pregnant patients with unexplained recurrent miscarriage. *Thromb Haemost*. mars 2012;107(3):507- 12.

108. Erez O, Hoppensteadt D, Romero R, Espinoza J, Goncalves L, Nien JK, et al. Preeclampsia is associated with low concentrations of protein Z. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* sept 2007;20(9):661- 7.
109. Gowri V, Mathew M, Gravell D, AlFalahi K, Zakwani I, Ganguly SS, et al. Protein Z levels in pregnant Omani women: correlation with pregnancy outcome. *J Thromb Thrombolysis.* nov 2011;32(4):453- 8.
110. Gris J-C, Quéré I, Dechaud H, Mercier E, Pinçon C, Hoffet M, et al. High frequency of protein Z deficiency in patients with unexplained early fetal loss. *Blood.* 1 avr 2002;99(7):2606- 8.
111. Nien JK, Romero R, Hoppensteadt D, Erez O, Espinoza J, Soto E, et al. Pyelonephritis during pregnancy: a cause for an acquired deficiency of protein Z. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* sept 2008;21(9):629- 37.
112. Grandone E, Colaizzo D, Cappucci F, Cocomazzi N, Margaglione M. Protein Z levels and unexplained fetal losses. *Fertil Steril.* oct 2004;82(4):982- 3.
113. Bretelle F, Arnoux D, Shojai R, D'Ercole C, Sampol J, Dignat F, et al. Protein Z in patients with pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol.* nov 2005;193(5):1698- 702.
114. Paidas MJ, Ku D-HW, Lee M-J, Manish S, Thurston A, Lockwood CJ, et al. Protein Z, protein S levels are lower in patients with thrombophilia and subsequent pregnancy complications. *J Thromb Haemost JTH.* mars 2005;3(3):497- 501.
115. Kusanovic JP, Espinoza J, Romero R, Hoppensteadt D, Nien JK, Kim CJ, et al. Plasma protein Z concentrations in pregnant women with idiopathic intrauterine bleeding and in women with spontaneous preterm labor. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* juin 2007;20(6):453- 63.
116. Topalidou M, Effraimidou S, Farmakiotis D, Papadakis E, Papaioannou G, Korantzis I, et al. Low protein Z levels, but not the intron F G79A polymorphism, are associated with unexplained pregnancy loss. *Thromb Res.* mai 2009;124(1):24- 7.
117. Kaygusuz I, Firatli-Tuglular T, Toptas T, Ugurel V, Demir M. Low levels of protein Z are associated with HELLP syndrome and its severity. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb.* avr 2011;17(2):214- 9.
118. Al-Shaikh FS, Sater MS, Finan RR, Racoubian E, Abu-Hijleh TM, Mustafa FE, et al. Protein Z variants associated with protein Z plasma levels and with risk of idiopathic recurrent miscarriage. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* sept 2013;20(9):1062- 8.
119. Gris J-C, Amadio C, Mercier E, Lavigne-Lissalde G, Déchaud H, Hoffet M, et al. Anti-protein Z antibodies in women with pathologic pregnancies. *Blood.* 15 juin 2003;101(12):4850- 2.
120. Gris J-C, Mercier E, Quéré I, Lavigne-Lissalde G, Cochery-Nouvellon E, Hoffet M, et al. Low-molecular-weight heparin versus low-dose aspirin in women with one fetal loss and a constitutional thrombophilic disorder. *Blood.* 15 mai 2004;103(10):3695- 9.
121. Erez O, Romero R, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, et al. Maternal anti-protein Z antibodies in pregnancies complicated by pre-eclampsia, SGA and fetal

- death. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* août 2009;22(8):662- 71.
122. Sater MS, Finan RR, Al-Hammad SA, Mohammed FA, Issa AA, Almawi WY. High Frequency of anti-protein Z IgM and IgG autoantibodies in women with idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. mai 2011;65(5):526- 31.
123. Amiral J, Peyrafitte M, Dunois C, Vissac AM, Seghatchian J. Anti-phospholipid syndrome: Current opinion on mechanisms involved, laboratory characterization and diagnostic aspects. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis.* août 2017;56(4):612- 25.
124. McColl MD, Deans A, Maclean P, Tait RC, Greer IA, Walker ID. Plasma protein Z deficiency is common in women with antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol.* mars 2003;120(5):913- 4.
125. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Lu L, Broze GJ. Autoimmune antiphospholipid antibodies impair the inhibition of activated factor X by protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor. *J Thromb Haemost JTH.* août 2003;1(8):1764- 70.
126. Sailer T, Vormittag R, Koder S, Quehenberger P, Kaider A, Pabinger I. Clinical significance of anti-protein Z antibodies in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Res.* 2008;122(2):153- 60.
127. Andriamandimbisoa T-H, Kahn J-E, Bourdain F, François D, Vasse M. High frequency of anti-protein Z antibodies in patients with anticardiolipin antibodies. *Immunobiology.* 6 août 2018;
128. Yousry SM, Shahin RMH, El Refai RM. Contribution of protein Z gene single-nucleotide polymorphism to systemic lupus erythematosus in Egyptian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* sept 2016;27(6):691- 5.
129. Vasse M, Denoyelle C, Legrand E, Vannier J-P, Soria C. Weak Regulation of Protein Z Biosynthesis by Inflammatory Cytokines. *Thromb Haemost.* 2002;87(2):350- 1.
130. Undar L, Karadoğan I, Oztürk F. Plasma protein Z levels inversely correlate with plasma interleukin-6 levels in patients with acute leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Thromb Res.* 15 avr 1999;94(2):131- 4.
131. Gutwein O, Rahimi-Levene N, Herzog-Tzarfati K, Garach-Jehoshua O, Nagler A, Izak M, et al. Low Protein Z levels in patients with plasma cell neoplasms are inversely correlated with IL-6 levels. *Leuk Res.* 2017;62:104- 7.
132. Cesari F, Gori AM, Fedi S, Abbate R, Gensini GF, Sofi F. Modifications of protein Z and interleukin-6 during the acute phase of coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* 2007;(1):85- 6.
133. Freue GVC, Sasaki M, Meredith A, Günther OP, Bergman A, Takhar M, et al. Proteomic signatures in plasma during early acute renal allograft rejection. *Mol Cell Proteomics MCP.* sept 2010;9(9):1954- 67.
134. Kim SY, Kim J-E, Kim YJ, Han K-S, Kim HK. Prominent protein Z-induced thrombin inhibition in cirrhosis: a new functional assay for hypercoagulability assessment. *J Gastroenterol Hepatol.* avr 2015;30(4):784- 93.

135. Shang Y, Pan X-Y, Ding C-P, Yang X-M, Cai X-Y, Ding Y, et al. [Clinical significance of protein Z detection in patients with malignant tumors]. *Ai Zheng Aizheng Chin J Cancer*. sept 2005;24(9):1144- 7.
136. Capurso G, Lattimore S, Crnogorac-Jurcevic T, Panzuto F, Milione M, Bhakta V, et al. Gene expression profiles of progressive pancreatic endocrine tumours and their liver metastases reveal potential novel markers and therapeutic targets. *Endocr Relat Cancer*. juin 2006;13(2):541- 58.
137. Leja J, Essaghir A, Essand M, Wester K, Oberg K, Tötterman TH, et al. Novel markers for enterochromaffin cells and gastrointestinal neuroendocrine carcinomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. févr 2009;22(2):261- 72.
138. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Ostrowska-Cichocka K, Zimnoch L. Protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) is present in loco in human breast cancer tissue. *Thromb Haemost*. juill 2010;104(1):183- 5.
139. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zimnoch L, Tokajuk P, Kisiel W. Protein Z is present in human breast cancer tissue. *Int J Hematol*. mai 2011;93(5):681- 3.
140. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zimnoch L, Ostrowska-Cichocka K, Tokajuk P, Ramlau R, et al. Protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor system in human non-small-cell lung cancer tissue. *Thromb Res*. avr 2012;129(4):e92-96.
141. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zimnoch L, Tokajuk P, Ostrowska-Cichocka K, Kisiel W. Co-localization of Protein Z, Protein Z-Dependent protease inhibitor and coagulation factor X in human colon cancer tissue: implications for coagulation regulation on tumor cells. *Thromb Res*. avr 2012;129(4):e112-118.
142. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zimnoch L, Tokajuk P, Ostrowska-Cichocka K, Kisiel W. Protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor system in loco in human gastric cancer. *Ann Hematol*. mai 2014;93(5):779- 84.
143. El-Hamid SA, El-Khayat W. Relationship of the protein Z intron F G79A and IL6 C634G gene polymorphisms with the risk of recurrent pregnancy loss in Egyptian women. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res*. avr 2011;59(4):655- 60.
144. Grandone E, Colaizzo D, Cappucci F, D'Ambrosio RL, Vecchione G, Margaglione M. An unreported mutation within protein Z gene is associated with very low protein levels in women with fetal loss. *Fertil Steril*. sept 2008;90(3):864- 5.
145. Cam-Duchez VL, Soria C, dit Sollier CB, Borg J-Y, Coudert M, Montalescot G, et al. Rare genotypes of protein Z gene are a risk factor for premature myocardial infarction but not protein Z plasma level. *Thromb Haemost* [Internet]. 12 mai 2009 [cité 14 juin 2016]; Disponible sur: <http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH09-01-0007>
146. Fabbro D, Barillari G, Damante G. Mutations R67X and W303X of the protein Z-dependent protease inhibitor gene and venous thromboembolic disease: a case-control study in Italian subjects. *J Thromb Thrombolysis*. févr 2007;23(1):77- 8.
147. AlShaikh FS, Finan RR, Almawi AW, Mustafa FE, Almawi WY. Association of the R67X and W303X non-sense polymorphisms in the protein Z-dependent protease inhibitor gene with idiopathic recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod*. mars 2012;18(3):156- 60.

148. Karakoyun S, Gürsoy MO, Kalçık M, Yesin M, Gündüz S, Astarcioglu MA, et al. The role of protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor polymorphisms in the development of prosthetic heart valve thrombosis. *Anatol J Cardiol.* mai 2016;16(5):361- 3.
149. Gorski MM, Lotta LA, Pappalardo E, de Haan HG, Passamonti SM, van Hylckama Vlieg A, et al. Single Nucleotide Variant rs2232710 in the Protein Z-Dependent Protease Inhibitor (ZPI, SERPINA10) Gene Is Not Associated with Deep Vein Thrombosis. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151347.
150. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 24 févr 2006;124(4):783- 801.
151. Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev.* nov 2015;24(Pt A):29- 39.
152. O'Brien M. The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. *Top Companion Anim Med.* mai 2012;27(2):46- 52.
153. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 mars 1999;96(5):2311- 5.
154. Müller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* mars 2003;17(3):476- 8.
155. Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frère C, Bonier R, Mackman N, et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood.* 6 sept 2012;120(10):2133- 43.
156. Moosbauer C, Morgenstern E, Cuvelier SL, Manukyan D, Bidzhekov K, Albrecht S, et al. Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood.* 1 févr 2007;109(3):995- 1002.
157. Zillmann A, Luther T, Müller I, Kotzsch M, Spannagl M, Kauke T, et al. Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 23 févr 2001;281(2):603- 9.
158. Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* août 2010;16(8):887- 96.
159. Hippenstiel S, Suttrop N. Interaction of pathogens with the endothelium. *Thromb Haemost.* janv 2003;89(1):18- 24.
160. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest.* mars 1999;103(6):879- 87.
161. Bogatcheva NV, Garcia JGN, Verin AD. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochem Biokhimiia.* janv 2002;67(1):75- 84.
162. Pawlinski R, Mackman N. Tissue factor, coagulation proteases, and protease-activated receptors in endotoxemia and sepsis. *Crit Care Med.* mai 2004;32(5 Suppl):S293-297.

163. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 5 mars 2004;303(5663):1532- 5.
164. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J Innate Immun*. 15 juin 2018;1- 8.
165. Wong SL, Wagner DD. Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 20 juin 2018;fj201800691R.
166. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 9 avr 2012;209(4):819- 35.
167. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 sept 2010;107(36):15880- 5.
168. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. avr 2007;13(4):463- 9.
169. Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, Cody MJ, Franks Z, Tolley ND, et al. Novel anti-bacterial activities of  $\beta$ -defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog*. nov 2011;7(11):e1002355.
170. Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. avr 2011;11(4):264- 74.
171. Haselmayer P, Grosse-Hovest L, von Landenberg P, Schild H, Radsak MP. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood*. 1 août 2007;110(3):1029- 35.
172. Reinhardt C, von Brühl M-L, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, et al. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest*. mars 2008;118(3):1110- 22.
173. Brown MRW, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 nov 2004;101(46):16085- 7.
174. Gershom ES, Sutherland MR, Lollar P, Prydzial ELG. Involvement of the contact phase and intrinsic pathway in herpes simplex virus-initiated plasma coagulation. *J Thromb Haemost JTH*. mai 2010;8(5):1037- 43.
175. Frick I-M, Björck L, Herwald H. The dual role of the contact system in bacterial infectious disease. *Thromb Haemost*. sept 2007;98(3):497- 502.
176. Scharfstein J, Andrade D, Svensjö E, Oliveira AC, Nascimento CR. The kallikrein-kinin system in experimental Chagas disease: a paradigm to investigate the impact of inflammatory edema on GPCR-mediated pathways of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Front Immunol*. 2012;3:396.
177. Nickel KF, Renné T. Crosstalk of the plasma contact system with bacteria. *Thromb Res*. oct 2012;130 Suppl 1:S78-83.

178. Ben Nasr A, Herwald H, Sjöbring U, Renné T, Müller-Esterl W, Björck L. Absorption of kininogen from human plasma by *Streptococcus pyogenes* is followed by the release of bradykinin. *Biochem J.* 15 sept 1997;326 ( Pt 3):657- 60.
179. Wollein Waldetoft K, Svensson L, Mörgelin M, Olin AI, Nitsche-Schmitz DP, Björck L, et al. Streptococcal surface proteins activate the contact system and control its antibacterial activity. *J Biol Chem.* 20 juill 2012;287(30):25010- 8.
180. Rao NN, Gómez-García MR, Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:605- 47.
181. Imamura T, Potempa J, Pike RN, Travis J. Dependence of vascular permeability enhancement on cysteine proteinases in vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* mai 1995;63(5):1999- 2003.
182. Roese O, Bouma BN, Stadaas JO, Aasen AO. Dose dependence of endotoxin-induced activation of the plasma contact system: an in vitro study. *Circ Shock.* déc 1988;26(4):419- 30.
183. Kalter ES, van Dijk WC, Timmerman A, Verhoef J, Bouma BN. Activation of purified human plasma prekallikrein triggered by cell wall fractions of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* oct 1983;148(4):682- 91.
184. DeLa Cadena RA, Suffredini AF, Page JD, Pixley RA, Kaufman N, Parrillo JE, et al. Activation of the kallikrein-kinin system after endotoxin administration to normal human volunteers. *Blood.* 15 juin 1993;81(12):3313- 7.
185. Minnema MC, Pajkrt D, Wuillemin WA, Roem D, Bleeker WK, Levi M, et al. Activation of clotting factor XI without detectable contact activation in experimental human endotoxemia. *Blood.* 1 nov 1998;92(9):3294- 301.
186. Ghebrehiwet B, Kaplan AP, Joseph K, Peerschke EIB. The complement and contact activation systems: partnership in pathogenesis beyond angioedema. *Immunol Rev.* 2016;274(1):281- 9.
187. Madeddu P, Emanuelli C, Gaspa L, Salis B, Milia AF, Chao L, et al. Role of the bradykinin B2 receptor in the maturation of blood pressure phenotype: lesson from transgenic and knockout mice. *Immunopharmacology.* 15 oct 1999;44(1- 2):9- 13.
188. Schmaier AH. The elusive physiologic role of Factor XII. *J Clin Invest.* sept 2008;118(9):3006- 9.
189. DiScipio RG. The activation of the alternative pathway C3 convertase by human plasma kallikrein. *Immunology.* mars 1982;45(3):587- 95.
190. Toossi Z, Sedor JR, Mettler MA, Everson B, Young T, Ratnoff OD. Induction of expression of monocyte interleukin 1 by Hageman factor (factor XII). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 déc 1992;89(24):11969- 72.
191. Khan MM, Bradford HN, Isordia-Salas I, Liu Y, Wu Y, Espinola RG, et al. High-molecular-weight kininogen fragments stimulate the secretion of cytokines and chemokines through uPAR, Mac-1, and gC1qR in monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* oct 2006;26(10):2260- 6.

192. Sato E, Koyama S, Nomura H, Kubo K, Sekiguchi M. Bradykinin stimulates alveolar macrophages to release neutrophil, monocyte, and eosinophil chemotactic activity. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 oct 1996;157(7):3122- 9.
193. Paegelow I, Trzeciak S, Böckmann S, Vietinghoff G. Migratory responses of polymorphonuclear leukocytes to kinin peptides. *Pharmacology*. nov 2002;66(3):153- 61.
194. Frick I-M, Akesson P, Herwald H, Mörgelin M, Malmsten M, Nägler DK, et al. The contact system--a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides. *EMBO J*. 29 nov 2006;25(23):5569- 78.
195. Nordahl EA, Rydengård V, Mörgelin M, Schmidtchen A. Domain 5 of high molecular weight kininogen is antibacterial. *J Biol Chem*. 14 oct 2005;280(41):34832- 9.
196. Morrison DC, Cochrane CG. Direct evidence for Hageman factor (factor XII) activation by bacterial lipopolysaccharides (endotoxins). *J Exp Med*. 1 sept 1974;140(3):797- 811.
197. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*. 11 déc 2009;139(6):1143- 56.
198. Bergmann S, Hammerschmidt S. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost*. sept 2007;98(3):512- 20.
199. Sun H, Ringdahl U, Homeister JW, Fay WP, Engleberg NC, Yang AY, et al. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science*. 27 août 2004;305(5688):1283- 6.
200. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol CB*. 21 févr 2006;16(4):396- 400.
201. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol CB*. 21 févr 2006;16(4):401- 7.
202. Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS Pathog*. 5 août 2010;6(8):e1001036.
203. Guggenberger C, Wolz C, Morrissey JA, Heesemann J. Two distinct coagulase-dependent barriers protect *Staphylococcus aureus* from neutrophils in a three dimensional in vitro infection model. *PLoS Pathog*. janv 2012;8(1):e1002434.
204. Lipinska-Gediga M. Coagulopathy in sepsis - a new look at an old problem. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2016;48(5):352- 9.
205. Tsukamoto T, Chanthaphavong RS, Pape H-C. Current theories on the pathophysiology of multiple organ failure after trauma. *Injury*. janv 2010;41(1):21- 6.
206. Delabranche X, Helms J, Meziani F. Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Ann Intensive Care* [Internet]. 2 déc 2017 [cité 9 avr 2018];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5712298/>

207. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23 févr 2016;315(8):801- 10.
208. Vincent J-L, De Backer D. Circulatory shock. *N Engl J Med*. 31 oct 2013;369(18):1726- 34.
209. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. juin 1992;101(6):1644- 55.
210. Dulhunty JM, Lipman J, Finfer S, Sepsis Study Investigators for the ANZICS Clinical Trials Group. Does severe non-infectious SIRS differ from severe sepsis? Results from a multi-centre Australian and New Zealand intensive care unit study. *Intensive Care Med*. sept 2008;34(9):1654- 61.
211. Gando S, Iba T, Eguchi Y, Ohtomo Y, Okamoto K, Koseki K, et al. A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for critically ill patients: comparing current criteria. *Crit Care Med*. mars 2006;34(3):625- 31.
212. Hayakawa M, Gando S, Hoshino H. A prospective comparative study of three sets of criteria for disseminated intravascular coagulation: ISTH criteria vs Japanese criteria. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. janv 2007;13(1):65- 72.
213. Taylor FB, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M, Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*. nov 2001;86(5):1327- 30.
214. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:165974.
215. Kumolosasi E, Salim E, Jantan I, Ahmad W. Kinetics of Intracellular, Extracellular and Production of Pro-Inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide- Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Trop J Pharm Res*. 1 janv 2014;13(4):536-543- 543.
216. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*. févr 2004;202(2):145- 56.
217. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010;20(2):87- 103.
218. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg*. avr 1992;215(4):356- 62.
219. Preiser JC, Schmartz D, Van der Linden P, Content J, Vanden Bussche P, Buurman W, et al. Interleukin-6 administration has no acute hemodynamic or hematologic effect in the dog. *Cytokine*. janv 1991;3(1):1- 4.
220. Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets*. déc 2013;17(12):1439- 60.

221. Shahrara S, Proudfoot AEI, Woods JM, Ruth JH, Amin MA, Park CC, et al. Amelioration of rat adjuvant-induced arthritis by Met-RANTES. *Arthritis Rheum.* juin 2005;52(6):1907- 19.
222. Cavillon J-M, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(9):535- 44.
223. Delanghe JR, Speeckaert MM. Translational research and biomarkers in neonatal sepsis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 7 déc 2015;451(Pt A):46- 64.
224. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature.* 17 déc 1987;330(6149):662- 4.
225. Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS, et al. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med.* 1 nov 1989;170(5):1627- 33.
226. Opal SM, Cross AS, Kelly NM, Sadoff JC, Bodmer MW, Palardy JE, et al. Efficacy of a monoclonal antibody directed against tumor necrosis factor in protecting neutropenic rats from lethal infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis.* juin 1990;161(6):1148- 52.
227. Hinshaw LB, Tekamp-Olson P, Chang AC, Lee PA, Taylor FB, Murray CK, et al. Survival of primates in LD100 septic shock following therapy with antibody to tumor necrosis factor (TNF alpha). *Circ Shock.* mars 1990;30(3):279- 92.
228. Hinshaw LB, Emerson TE, Taylor FB, Chang AC, Duerr M, Peer GT, et al. Lethal *Staphylococcus aureus*-induced shock in primates: prevention of death with anti-TNF antibody. *J Trauma.* oct 1992;33(4):568- 73.
229. Cohen J, Carlet J. INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis. International Sepsis Trial Study Group. *Crit Care Med.* sept 1996;24(9):1431- 40.
230. Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, et al. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet Lond Engl.* 28 mars 1998;351(9107):929- 33.
231. Remick DG. Cytokine therapeutics for the treatment of sepsis: why has nothing worked? *Curr Pharm Des.* 2003;9(1):75- 82.
232. Fourrier F, Jourdain M, Tournois A, Caron C, Goudemand J, Chopin C. Coagulation inhibitor substitution during sepsis. *Intensive Care Med.* nov 1995;21 Suppl 2:S264-268.
233. Sakr Y, Reinhart K, Hagel S, Kientopf M, Brunkhorst F. Antithrombin levels, morbidity, and mortality in a surgical intensive care unit. *Anesth Analg.* sept 2007;105(3):715- 23.
234. Wiedermann CJ, Römisch J. The anti-inflammatory actions of antithrombin--a review. *Acta Med Austriaca.* 2002;29(3):89- 92.
235. Wiedermann CJ, Hoffmann JN, Juers M, Ostermann H, Kienast J, Briegel J, et al. High-dose antithrombin III in the treatment of severe sepsis in patients with a high risk of death: efficacy and safety. *Crit Care Med.* févr 2006;34(2):285- 92.

236. Kienast J, Juers M, Wiedermann CJ, Hoffmann JN, Ostermann H, Strauss R, et al. Treatment effects of high-dose antithrombin without concomitant heparin in patients with severe sepsis with or without disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost JTH*. janv 2006;4(1):90- 7.
237. Allingstrup M, Wetterslev J, Ravn FB, Møller AM, Afshari A. Antithrombin III for critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 8 févr 2016;2:CD005370.
238. Wiedermann CJ. Antithrombin concentrate use in disseminated intravascular coagulation of sepsis: meta-analyses revisited. *J Thromb Haemost JTH*. mars 2018;16(3):455- 7.
239. Bouwens E a. M, Stavenuiter F, Mosnier LO. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost JTH*. juin 2013;11 Suppl 1:242- 53.
240. Taylor FB, Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest*. mars 1987;79(3):918- 25.
241. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 8 mars 2001;344(10):699- 709.
242. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut J-F, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *N Engl J Med*. 31 mai 2012;366(22):2055- 64.
243. Kalil AC, LaRosa SP. Effectiveness and safety of drotrecogin alfa (activated) for severe sepsis: a meta-analysis and metaregression. *Lancet Infect Dis*. sept 2012;12(9):678- 86.
244. Pappalardo F, Crivellari M, Di Prima AL, Agracheva N, Celinska-Spodar M, Lembo R, et al. Protein C zymogen in severe sepsis: a double-blinded, placebo-controlled, randomized study. *Intensive Care Med*. nov 2016;42(11):1706- 14.
245. Ito T, Kawahara K, Okamoto K, Yamada S, Yasuda M, Imaizumi H, et al. Proteolytic cleavage of high mobility group box 1 protein by thrombin-thrombomodulin complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. oct 2008;28(10):1825- 30.
246. Ito T, Maruyama I. Thrombomodulin: protectorate God of the vasculature in thrombosis and inflammation. *J Thromb Haemost JTH*. juill 2011;9 Suppl 1:168- 73.
247. Vincent J-L, Ramesh MK, Ernest D, LaRosa SP, Pacht J, Aikawa N, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase 2b study to evaluate the safety and efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin, ART-123, in patients with sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med*. sept 2013;41(9):2069- 79.
248. Allen KS, Sawheny E, Kinasewitz GT. Anticoagulant modulation of inflammation in severe sepsis. *World J Crit Care Med*. 4 mai 2015;4(2):105- 15.
249. Saito H, Maruyama I, Shimazaki S, Yamamoto Y, Aikawa N, Ohno R, et al. Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in disseminated intravascular coagulation: results of a phase III, randomized, double-blind clinical trial. *J Thromb Haemost JTH*. janv 2007;5(1):31- 41.

250. Hayakawa M, Yamakawa K, Saito S, Uchino S, Kudo D, Iizuka Y, et al. Recombinant human soluble thrombomodulin and mortality in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. A multicentre retrospective study. *Thromb Haemost.* 02 2016;115(6):1157- 66.
251. Creasey AA, Reinhart K. Tissue factor pathway inhibitor activity in severe sepsis. *Crit Care Med.* juill 2001;29(7 Suppl):S126-129.
252. van den Boogaard FE, Hofstra JJ, van 't Veer C, Levi MM, Roelofs JJTH, van der Poll T, et al. Feasibility and Safety of Local Treatment with Recombinant Human Tissue Factor Pathway Inhibitor in a Rat Model of Streptococcus pneumoniae Pneumonia. *PloS One.* 2015;10(5):e0127261.
253. Creasey AA, Chang AC, Feigen L, Wün TC, Taylor FB, Hinshaw LB. Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from Escherichia coli septic shock. *J Clin Invest.* juin 1993;91(6):2850- 60.
254. Koudsi B, Chatman DM, Ballinger BA, Ferguson EW, Kraemer BA, Miller GA, et al. Tissue factor pathway inhibitor protects the ischemic spinal cord. *J Surg Res.* juin 1996;63(1):174- 8.
255. Abraham E, Reinhart K, Svoboda P, Seibert A, Olthoff D, Dal Nogare A, et al. Assessment of the safety of recombinant tissue factor pathway inhibitor in patients with severe sepsis: a multicenter, randomized, placebo-controlled, single-blind, dose escalation study. *Crit Care Med.* nov 2001;29(11):2081- 9.
256. Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, Rodriguez AL, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 9 juill 2003;290(2):238- 47.
257. Kenne E, Renné T. Factor XII: a drug target for safe interference with thrombosis and inflammation. *Drug Discov Today.* sept 2014;19(9):1459- 64.
258. Chen Z, Seiffert D, Hawes B. Inhibition of Factor XI activity as a promising antithrombotic strategy. *Drug Discov Today.* sept 2014;19(9):1435- 9.
259. Leid RW, Ballieux BE, van der Heijden I, Kleyburg-van der Keur C, Hagen EC, van Es LA, et al. Cleavage and inactivation of human C1 inhibitor by the human leukocyte proteinase, proteinase 3. *Eur J Immunol.* nov 1993;23(11):2939- 44.
260. Nuijens JH, Eerenberg-Belmer AJ, Huijbregts CC, Schreuder WO, Felt-Bersma RJ, Abbink JJ, et al. Proteolytic inactivation of plasma C1- inhibitor in sepsis. *J Clin Invest.* août 1989;84(2):443- 50.
261. Igonin AA, Protsenko DN, Galstyan GM, Vlasenko AV, Khachatryan NN, Nekhaev IV, et al. C1-esterase inhibitor infusion increases survival rates for patients with sepsis\*. *Crit Care Med.* mars 2012;40(3):770- 7.
262. Pixley RA, De La Cadena R, Page JD, Kaufman N, Wyshock EG, Chang A, et al. The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in lethal bacteremia. In vivo use of a monoclonal anti-factor XII antibody to block contact activation in baboons. *J Clin Invest.* janv 1993;91(1):61- 8.

263. Larsson M, Rayzman V, Nolte MW, Nickel KF, Björkqvist J, Jämsä A, et al. A factor XIIa inhibitory antibody provides thromboprotection in extracorporeal circulation without increasing bleeding risk. *Sci Transl Med.* 5 févr 2014;6(222):222ra17.
264. Tucker EI, Verboon NG, Leung PY, Hurst S, McCarty OJT, Gailani D, et al. Inhibition of factor XI activation attenuates inflammation and coagulopathy while improving the survival of mouse polymicrobial sepsis. *Blood.* 17 mai 2012;119(20):4762- 8.
265. Bane CE, Ivanov I, Matafonov A, Boyd KL, Cheng Q, Sherwood ER, et al. Factor XI Deficiency Alters the Cytokine Response and Activation of Contact Proteases during Polymicrobial Sepsis in Mice. *PLoS ONE [Internet].* 5 avr 2016 [cité 12 déc 2017];11(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4821616/>
266. Nakamura M, Takeuchi T, Kawahara T, Hirose J, Nakayama K, Hosaka Y, et al. Simultaneous targeting of CD14 and factor XIa by a fusion protein consisting of an anti-CD14 antibody and the modified second domain of bikunin improves survival in rabbit sepsis models. *Eur J Pharmacol.* 5 mai 2017;802:60- 8.
267. Stroo I, Zeerleder S, Ding C, Luken BM, Roelofs JJTH, de Boer OJ, et al. Coagulation factor XI improves host defence during murine pneumonia-derived sepsis independent of factor XII activation. *Thromb Haemost.* 26 2017;117(8):1601- 14.
268. Butschkau A, Nagel P, Grambow E, Zechner D, Broze GJ, Vollmar B. Contribution of protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor in generalized Shwartzman reaction. *Crit Care Med.* déc 2013;41(12):e447-456.
269. Choi Q, Hong KH, Kim J-E, Kim HK. Changes in plasma levels of natural anticoagulants in disseminated intravascular coagulation: high prognostic value of antithrombin and protein C in patients with underlying sepsis or severe infection. *Ann Lab Med.* mars 2014;34(2):85- 91.
270. Lee N, Kim J-E, Gu J-Y, Yoo HJ, Kim I, Yoon S-S, et al. Protein Z efficiently depletes thrombin generation in disseminated intravascular coagulation with poor prognosis. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* janv 2016;27(1):84- 9.
271. Sipahi T, Kuybulu A, Ozturk A, Akar N. Protein Z G79A polymorphism in patients with severe sepsis. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb.* juin 2010;16(3):334- 6.
272. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol.* avr 2011;19(4):198- 208.
273. Zhang J, Broze GJ, Jr. Mouse Protein Z-Dependent Protease Inhibitor cDNA. *Thromb Haemost.* 2001;85(5):861- 5.
274. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc.* 2009;4(1):31- 6.
275. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* juill 1999;6(7):1258- 66.
276. Marx I, Lenting PJ, Adler T, Pendu R, Christophe OD, Denis CV. Correction of bleeding symptoms in von Willebrand factor-deficient mice by liver-expressed von Willebrand factor mutants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mars 2008;28(3):419- 24.

277. Jordan RE, Kilpatrick J, Nelson RM. Heparin promotes the inactivation of antithrombin by neutrophil elastase. *Science*. 14 août 1987;237(4816):777- 9.
278. Higuchi DA, Wun TC, Likert KM, Broze GJ. The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood*. 1 avr 1992;79(7):1712- 9.
279. Oates AM, Salem HH. The binding and regulation of protein S by neutrophils. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*. oct 1991;2(5):601- 7.
280. Eckle I, Seitz R, Egbring R, Kolb G, Havemann K. Protein S degradation in vitro by neutrophil elastase. *Scand J Clin Lab Invest*. mai 1993;53(3):281- 8.
281. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med*. 19 août 1999;341(8):586- 92.
282. Wuillemin WA, Minnema M, Meijers JC, Roem D, Eerenberg AJ, Nuijens JH, et al. Inactivation of factor XIa in human plasma assessed by measuring factor XIa-protease inhibitor complexes: major role for C1-inhibitor. *Blood*. 15 mars 1995;85(6):1517- 26.
283. Knauer DJ, Majumdar D, Fong PC, Knauer MF. SERPIN regulation of factor XIa. The novel observation that protease nexin 1 in the presence of heparin is a more potent inhibitor of factor XIa than C1 inhibitor. *J Biol Chem*. 1 déc 2000;275(48):37340- 6.
284. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost*. avr 1998;79(4):706- 8.
285. Lindqvist PG, Dahlbäck B. Carriership of Factor V Leiden and evolutionary selection advantage. *Curr Med Chem*. 2008;15(15):1541- 4.
286. Elisia I, Pae HB, Lam V, Cederberg R, Hofs E, Krystal G. Comparison of RAW264.7, human whole blood and PBMC assays to screen for immunomodulators. *J Immunol Methods*. 2018;452:26- 31.
287. van Dooren FH, Duijvis NW, te Velde AA. Analysis of cytokines and chemokines produced by whole blood, peripheral mononuclear and polymorphonuclear cells. *J Immunol Methods*. 31 oct 2013;396(1- 2):128- 33.
288. Krakauer T. Stimulant-dependent modulation of cytokines and chemokines by airway epithelial cells: cross talk between pulmonary epithelial and peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. janv 2002;9(1):126- 31.
289. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:787- 820.
290. Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol*. sept 2008;9(9):953- 9.
291. Yoon J-S, Kim H-H, Lee Y, Lee J-S. Cytokine induction by respiratory syncytial virus and adenovirus in bronchial epithelial cells. *Pediatr Pulmonol*. mars 2007;42(3):277- 82.
292. Culley FJ, Pennycook AMJ, Tregoning JS, Dodd JS, Walzl G, Wells TN, et al. Role of CCL5 (RANTES) in viral lung disease. *J Virol*. août 2006;80(16):8151- 7.

293. Shahrara S, Park CC, Temkin V, Jarvis JW, Volin MV, Pope RM. RANTES modulates TLR4-induced cytokine secretion in human peripheral blood monocytes. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 oct 2006;177(8):5077- 87.
294. Amati A-L, Zakrzewicz A, Siebers R, Wilker S, Heldmann S, Zakrzewicz D, et al. Chemokines (CCL3, CCL4, and CCL5) Inhibit ATP-Induced Release of IL-1 $\beta$  by Monocytic Cells. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1434872.
295. Møller A-SW, Bjerre A, Brusletto B, Joø GB, Brandtzaeg P, Kierulf P. Chemokine patterns in meningococcal disease. *J Infect Dis*. 1 mars 2005;191(5):768- 75.
296. Cavusoglu E, Eng C, Chopra V, Clark LT, Pinsky DJ, Marmur JD. Low plasma RANTES levels are an independent predictor of cardiac mortality in patients referred for coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. avr 2007;27(4):929- 35.
297. Conlon K, Lloyd A, Chattopadhyay U, Lukacs N, Kunkel S, Schall T, et al. CD8+ and CD45RA+ human peripheral blood lymphocytes are potent sources of macrophage inflammatory protein 1 alpha, interleukin-8 and RANTES. *Eur J Immunol*. mars 1995;25(3):751- 6.
298. Conti P, Barbacane RC, Feliciani C, Reale M. Expression and secretion of RANTES by human peripheral blood CD4+ cells are dependent on the presence of monocytes. *Ann Clin Lab Sci*. janv 2001;31(1):75- 84.
299. Dayer JM. How T-lymphocytes are activated and become activators by cell-cell interaction. *Eur Respir J Suppl*. sept 2003;44:10s-15s.
300. Isler P, Vey E, Zhang JH, Dayer JM. Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: a possible role of CD69. *Eur Cytokine Netw*. févr 1993;4(1):15- 23.
301. Manié S, Kubar J, Limouse M, Ferrua B, Ticchioni M, Breittmayer JP, et al. CD3-stimulated Jurkat T cells mediate IL-1 beta production in monocytic THP-1 cells. Role of LFA-1 molecule and participation of CD69 T cell antigen. *Eur Cytokine Netw*. févr 1993;4(1):7- 13.
302. McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med*. févr 1997;3(2):189- 95.
303. Ribbens C, Dayer JM, Chizzolini C. CD40-CD40 ligand (CD154) engagement is required but may not be sufficient for human T helper 1 cell induction of interleukin-2- or interleukin-15-driven, contact-dependent, interleukin-1beta production by monocytes. *Immunology*. févr 2000;99(2):279- 86.
304. Guttman O, Baranovski BM, Schuster R, Kaner Z, Freixo-Lima GS, Bahar N, et al. Acute-phase protein  $\alpha$ 1-anti-trypsin: diverting injurious innate and adaptive immune responses from non-authentic threats. *Clin Exp Immunol*. févr 2015;179(2):161- 72.
305. Ehlers MR. Immune-modulating effects of alpha-1 antitrypsin. *Biol Chem*. oct 2014;395(10):1187- 93.
306. Janciauskiene S, Larsson S, Larsson P, Virtala R, Jansson L, Stevens T. Inhibition of lipopolysaccharide-mediated human monocyte activation, in vitro, by alpha1-antitrypsin. *Biochem Biophys Res Commun*. 27 août 2004;321(3):592- 600.

307. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 14 janv 1999;340(2):115- 26.
308. Butschkau A, Wagner N-M, Bierhansl L, Genz B, Vollmar B. Protein Z-deficiency is associated with enhanced neointima formation and inflammatory response after vascular injury in mice. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(9):6064- 71.
309. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 01 2017;195(5):557- 82.
310. Celli BR, MacNee W, ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J*. juin 2004;23(6):932- 46.
311. Zuo L, Pannell BK, Zhou T, Chuang C-C. Historical role of alpha-1-antitrypsin deficiency in respiratory and hepatic complications. *Gene*. 10 sept 2016;589(2):118- 22.
312. Janus ED, Phillips NT, Carrell RW. Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet Lond Engl*. 19 janv 1985;1(8421):152- 4.
313. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of  $\alpha$ 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med*. août 2011;105(8):1129- 39.
314. Dziedzic T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke. *Expert Rev Neurother*. mai 2015;15(5):523- 31.
315. Berger M, Liu M, Uknis ME, Koulmanda M. Alpha-1-antitrypsin in cell and organ transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. juill 2018;18(7):1589- 95.
316. Gao W, Zhao J, Kim H, Xu S, Chen M, Bai X, et al.  $\alpha$ 1-Antitrypsin inhibits ischemia reperfusion-induced lung injury by reducing inflammatory response and cell death. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. mars 2014;33(3):309- 15.
317. Koulmanda M, Bhasin M, Fan Z, Hanidziar D, Goel N, Putheti P, et al. Alpha 1-antitrypsin reduces inflammation and enhances mouse pancreatic islet transplant survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 sept 2012;109(38):15443- 8.
318. Deboudt C, Branchereau J, Luyckx F, Rigaud J, Glemain P, Blancho G, et al. [Pancreas transplantation and venous thrombosis: multivariate analysis of risk factors]. *Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol*. juin 2012;22(7):402- 7.
319. Terpos E, Politou M, Viniou N, Rahemtulla A. Significance of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. déc 2005;46(12):1699- 707.
320. Osman K, Comenzo R, Rajkumar SV. Deep venous thrombosis and thalidomide therapy for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 21 juin 2001;344(25):1951- 2.

**Titre :** Effets anti-inflammatoires de l'inhibiteur dépendant de la protéine Z : intérêt potentiel comme traitement adjuvant du sepsis.

**Mots clés :** sepsis, anticoagulant, inflammation, protéine Z, élastase neutrophile.

Le choc septique est une défaillance circulatoire aiguë déclenchée par un agent infectieux, entraînant des désordres hémodynamiques, métaboliques et viscéraux, en raison notamment de la libération de cytokines proinflammatoires. Le taux de mortalité est élevé (environ 40 %). L'évolution des sepsis sévères est souvent compliquée par des phénomènes thrombotiques qui résultent en partie de l'activation de la coagulation par les agents infectieux, mais aussi de la libération de *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) par les polynucléaires neutrophiles. Ainsi, chez ces patients, une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est souvent observée, caractérisée par un état d'équilibre instable, où co-existent un risque thrombotique et un risque hémorragique, dû à la consommation des facteurs de coagulation. Plusieurs études ont suggéré que l'administration d'antithrombine (AT) ou de Protéine C activée diminuait la mortalité, non seulement en diminuant l'activation de la coagulation, mais aussi en ayant des effets cytoprotecteurs et anti-inflammatoires indépendants de leur activité anticoagulante. Toutefois, leurs effets cytoprotecteurs nécessitent l'administration de doses élevées, responsables d'hémorragies.

L'inhibiteur dépendant de la protéine Z (ZPI) est une protéine appartenant à la superfamille des serpines, comme l'AT, mais possède une activité anticoagulante plus restreinte. Dans un modèle en sang total, j'ai observé que le ZPI exerce un effet inhibiteur sur la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) en réponse au lipopolysaccharide (LPS). A forte concentration (4 fois la concentration physiologique), l'effet anti-inflammatoire (EAI) du ZPI n'est pas modifié par l'ajout de PZ ou d'héparine non fractionnée, qui majorent l'effet anticoagulant du ZPI. De plus, l'EAI persiste avec un variant de ZPI muté sur son site actif (ZPI Y387A), suggérant que le ZPI possède un EAI indépendant de son activité anticoagulante. *In vitro*, en sang total, le ZPI augmente précocement la production de CCL5, une chimiokine ayant des propriétés anti-inflammatoires. Ces observations ont été confirmées dans un modèle d'endotoxémie *in vivo*, chez la souris, en injectant par voie intrapéritonéale du LPS. Les souris qui avaient reçu simultanément du ZPI recombinant humain ont un taux plasmatique plus faible d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  que les souris contrôles et un taux plus élevé de CCL5 dans le lavage péritonéal.

De plus, nous avons mis en évidence, en milieu purifié, que l'élastase neutrophile, une enzyme libérée à la surface des NETs induisait plusieurs clivages du ZPI. Le premier clivage se produit au niveau de la boucle réactive du ZPI, qui perd alors son activité inhibitrice sur les FXa et FXIa. La PZ ne protège pas le ZPI de sa dégradation par l'élastase. La dégradation du ZPI induite par les NETs pourrait participer à leurs propriétés procoagulantes.

Enfin, nous avons étudié les variations des taux plasmatiques de PZ et ZPI chez 100 patients atteints de sepsis sévère. Dans les premières 24 heures, nous avons observé une diminution du taux de PZ par rapport à un groupe de sujets sains, et à l'inverse, une augmentation d'environ 2,5 fois du taux de ZPI. Ce taux élevé de ZPI persiste à J3 et J7, alors que le taux de PZ augmente. Les variations de PZ ou ZPI ne sont pas prédictifs de la mortalité à 30 jours ni de l'apparition d'une CIVD.

Ces résultats suggèrent que des doses élevées de ZPI (4 fois la concentration physiologique) pourraient constituer un traitement adjuvant du choc septique, en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires, avec un risque hémorragique faible, puisque l'inhibition du FXIa a des activités antithrombotiques dépourvues de risque hémorragique.



**Title :** Anti-inflammatory effect of Protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) : a potential benefit on sepsis adjuvant therapy

**Key words :** sepsis, anticoagulant, inflammation, protein Z, neutrophil elastase

Septic shock is an acute circulatory failure triggered by an infectious agent, resulting in hemodynamic, metabolic and visceral disorders, notably due to a production of proinflammatory cytokines. The mortality rate is high (about 40 %). Severe sepsis is often complicated with thrombotic events. It results from an activation of coagulation by the infectious agent, but also from Neutrophil Extracellular Traps (NETs) release by neutrophils. Thus, disseminated intravascular coagulation (DIC) occurs frequently in these patients. DIC is characterized by an unstable equilibrium, where coexist a thrombotic risk due to excessive coagulation activation, and a bleeding risk, provoked by coagulation factors consumption. Many studies suggested the administration of antithrombin (AT) or activated protein C (APC) in septic patients, it may decrease mortality by limiting coagulation activation, but also thanks to their cytoprotector and antiinflammatory effects independent of their anticoagulant activity. However, high doses of AT and APC are required to induce their cytoprotector effects, resulting in an increased risk of bleeding events.

Protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) belongs to the serpin superfamily, as well as antithrombin, although its anticoagulant activity is more restricted. In a whole blood model, I observed that ZPI inhibits proinflammatory cytokines production (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) induced by lipopolysaccharid (LPS). At a high concentration (4 times physiologic level), the antiinflammatory effect of ZPI is not modified by the presence of protein Z or unfractionned heparin, which however increase ZPI anticoagulant activity. In addition, the antiinflammatory effect is maintained with a ZPI mutated on his reactive center loop (ZPI Y387A). These results suggest that ZPI has an antiinflammatory effect independent of his anticoagulant activity. In whole blood, an *in vitro* model, ZPI induced an early rise of CCL5 production, a chimiokine with antiinflammatory properties. These observations were confirmed *in vivo*, in a mouse endotoxemia model, using intraperitoneal LPS injection. Mice treated with recombinant human ZPI had lower IL-6 and TNF- $\alpha$  plasmatic levels compared with control mice, and higher peritoneal lavage CCL5 level.

In addition, we brought to light that neutrophil elastase, an enzyme attached to NETs, induced many cleavages of ZPI, in a purified system. The first cleavage occurs in the reactive center loop of ZPI, and results in a lost of its FXa and FXIa inhibition activities. PZ doesn't protect ZPI from elastase neutrophil degradation. Thus, ZPI degradation induced by NETs could participate to their procoagulant properties.

Lastly, we studied PZ and ZPI plasmatic level variations in 100 patients with severe sepsis. In the first 24 hours, decrease of PZ level was observed compared with the healthy volunteers group. Inversely, the ZPI level increased almost 2.5 times. This high ZPI plasmatic level is maintained at day 3 and day 7, while PZ level increases. PZ and ZPI plasmatic level variations don't predict nor mortality at 30 days nor DIC occurrence.

These results suggest that high dose of ZPI (4 times physiologic concentration) could be a septic shock adjuvant treatment by proinflammatory cytokines decrease, with low haemorrhagic risk, because FXIa inhibition has an antithrombotic activity without haemorrhagic risk.

