



HAL
open science

Impact de l'épicatéchine sur l'hémostase et la structure du caillot de fibrine

Thomas Sinegre

► **To cite this version:**

Thomas Sinegre. Impact de l'épicatéchine sur l'hémostase et la structure du caillot de fibrine. Santé. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC037 . tel-03621206

HAL Id: tel-03621206

<https://theses.hal.science/tel-03621206v1>

Submitted on 28 Mar 2022

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.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTE - AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Biologie Santé

Par **SINEGRE Thomas**

INRAE – UMR1019 - Nutrivasc

Impact de l'épicatéchine sur l'hémostase et la structure du caillot de fibrine

Soutenue publiquement le 17/06/2021, devant la commission d'examen.

Rapporteurs : Pr. Marie Christine ALESSI, Université Aix Marseille
Dr. David VAUZOUR, University of East Anglia

Directeurs de thèse : Dr. Christine MORAND, Université Clermont Auvergne
Dr. Aurélien LEBRETON, Université Clermont Auvergne

Examineurs : Pr. Christine VINCIGUERRA, Université Lyon 1

Président du jury : Pr. Marc BERGER, Université Clermont Auvergne

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTE - AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Biologie Santé

Par **SINEGRE Thomas**

INRAE – UMR1019 - Nutrivasc

Impact de l'épicatéchine sur l'hémostase et la structure du caillot de fibrine

Soutenue publiquement le 17/06/2021, devant la commission d'examen.

Rapporteurs : Pr. Marie Christine ALESSI, Université Aix Marseille
Dr. David VAUZOUR, University of East Anglia

Directeurs de thèse : Dr. Christine MORAND, Université Clermont Auvergne
Dr. Aurélien LEBRETON, Université Clermont Auvergne

Examineurs : Pr. Christine VINCIGUERRA, Université Lyon 1

Président du jury : Pr. Marc BERGER, Université Clermont Auvergne

Remerciements

À Madame le Professeur Marie Christine Alessi,

Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce manuscrit.

À Madame le Professeur Christine Vinciguerra,

C'est un honneur pour moi que vous siégiez dans mon jury. Merci de m'avoir donné le goût pour l'Hématologie sur les bancs de la Faculté de Pharmacie de Lyon.

À Monsieur le Professeur Marc Berger,

Merci pour votre confiance et votre soutien et merci de supporter mon caractère avec bienveillance.

À Monsieur le Docteur David Vauzour,

Merci de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de mon travail.

À Madame le Docteur Christine Morand,

Merci de m'avoir fait découvrir et donné le goût pour la Nutrition. Merci beaucoup pour tes conseils et tes encouragements, toujours précieux pour moi.

À Monsieur le Docteur Aurélien Lebreton,

Merci pour tes conseils, ton soutien et tout ce que tu m'as transmis depuis toutes ces années.

À Mes parents,

Pour votre confiance et votre soutien depuis toutes ces années. Vous m'avez permis d'avancer sereinement dans la vie.

À ma sœur Laureen,

Pour tous ces bons moments partagés. Vous avez avec Rémi et Léo toute mon affection.

À mes grands-parents,

Angèle et Guy, Michelle et Guy

Merci pour tout ce que vous m'avez apporté. J'espère vous avoir rendus fiers.

À toute ma famille,

Pour ces moments toujours joyeux et pour sa bienveillance.

À Alejandra,

Pour ton soutien et ton amour de chaque instant. Pour tous nos moments passés et surtout ceux à venir.

À tous mes amis,

Pour votre soutien et vos encouragements et surtout merci de faire preuve de philosophie face à mon humour.

À toute l'équipe du Laboratoire d'Hématologie du CHU,

Particulièrement à celle d'hémostase avec qui c'est un plaisir de travailler. Merci également à mes collègues, pour l'intérêt que j'ai à collaborer avec eux. Enfin merci à notre "Doyenne" Gabrielle, j'espère t'avoir beaucoup apporté.

À toute l'équipe de l'INRAE,

Pour m'avoir si bien accueilli et fait partager vos connaissances et compétences dans ce domaine nouveau pour moi.

Liste des publications

Article 1 : « Epicatechin influences primary hemostasis, coagulation and fibrinolysis »

Thomas Sinegre, Dorian Teissandier, Dragan Milenkovic, Christine Morand, Aurélien Lebreton

Food and Function. 2019 Nov 1;10(11):7291-7298

Article 2 : « Impact of Epicatechin on the Procoagulant Activities of Microparticles »

Thomas Sinegre, Dragan Milenkovic, Céline Bourgne, Dorian Teissandier, Yosra Nasri, Louis-Thomas Dannus, Christine Morand, Aurélien Lebreton

Nutrients. 2020 Sep 25;12(10):2935

Article 3 : « Impact of epicatechin on fibrin clot structure »

Thomas Sinegre, Dragan Milenkovic, Dorian Teissandier, Pauline Fully, Julien Bourdin, Christine Morand, Aurélien Lebreton

European Journal of Pharmacology. 2021 Feb 15;893:173830

Articles non-joints au manuscrit :

« Étude de la génération de thrombine dans une population pédiatrique »

Talon L, Sapin AF, Fourneyron V, Senectaire S, Tardieu M, Tillier M, Trapani A, Trayaud A, Vaissade A, Lebreton A, **Sinegre T**

Ann Biol Clin (Paris). 2020 Dec 1;78(6):629-638

« Thrombin Generation and Cirrhosis: State of the Art and Perspectives »

Lebreton A, **Sinegre T**, Lecompte T, Talon L, Abergel A, Lisman T.

Semin Thromb Hemost. 2020 Sep;46(6):693-703.

« Hypercoagulability (thrombin generation) in patients with cirrhosis is detected with ST-Genesisia »

Talon L, **Sinegre T**, Lecompte T, Pereira B, Massoulié S, Abergel A, Lebreton A.

J Thromb Haemost. 2020 Sep;18(9):2177-2190

« Hémorragie intracérébrale fatale chez un patient atteint d'une leucémie chronique à polynucléaires neutrophiles »

Talon L, de Renzis B, Fiore M, Sanhes L, Sapin AF, Berger M, **Sinègre T**, Lebreton A.

Rev Med Interne. 2020 Aug;41(8):552-558.

« Measurements of eftrenonacog alfa by 19 different combinations reagents/instrument:
A single-centre study »

Sinegre T, Trayaud A, Tardieu M, Fourneyron V, Talon L, Berger MG, Tillier M,
Senectaire S, Gembara P, Barbin AL, Vaissade A, Lebreton A.
Haemophilia. 2020 May;26(3):543-552

« The centrifuge brake impacts neither routine coagulation assays nor platelet count in
platelet-poor plasma »

Boissier E, Lakhal K, Talon L, Senage T, Rozec B, Roussel JC, **Sinegre T**, Lebreton A.
Clin Chem Lab Med. 2020 Feb 17;58(9):e185-e188.

« In vitro assessment of edoxaban anticoagulant effect in pediatric plasma »

Sinegre T, Zlobecki M, Doré E, Pereira B, Grèze V, Lebreton A.
Thromb Res. 2019 Jun;178:112-118

« Evaluation of a rapid centrifugation step (4500 g for 2 min) in coagulation assays to
monitor direct oral anticoagulants »

Brulé J, Revy S, Faure C, Eschalier R, Massoulié G, Tassin T, Pereira B, **Sinegre T**,
Lebreton A.
Clin Chem Lab Med. 2018 Dec 19;57(2):e37-e40

« Evaluation of the coagulometer STA R Max® (Stago) for routine coagulation
parameters »

Brulé J, **Sinegre T**, Pereira B, Berger MG, Serre-Sapin AF, Lebreton A.
Ann Biol Clin (Paris). 2018 Apr 1;76(2):143-149.

« Increased factor VIII plays a significant role in plasma hypercoagulability phenotype of
patients with cirrhosis »

Sinegre T, Duron C, Lecompte T, Pereira B, Massoulier S, Lamblin G, Abergel A,
Lebreton A.
J Thromb Haemost. 2018 Jun;16(6):1132-1140.

« Plasma hypercoagulability in the presence of thrombomodulin but not of activated
protein C in patients with cirrhosis »

Lebreton A, **Sinegre T**, Pereira B, Lamblin G, Duron C, Abergel A.
J Gastroenterol Hepatol. 2017 Apr;32(4):916-924.

« Faible sensibilité à l'action de la thrombomoduline chez le patient cirrhotique Intérêt de la thrombinographie »

Sinegre T, Abergel A, Sapin AF, Lamblin G, Marques-Verdier A, Duron C, Lebreton A. Ann Biol Clin (Paris). 2016 Mar-Apr;74(2):203-12

« Favorable outcome of rivaroxaban-associated intracerebral hemorrhage reversed by 4-factor prothrombin complex concentrate: impact on thrombin generation »

Kauffmann S, Chabanne R, Coste A, Longeras F, **Sinegre T**, Schmidt J, Samama CM, Constantin JM, Lebreton A.

A A Case Rep. 2015 Jun 1;4(11):151-4

Liste des abréviations

A

- α 2m : alpha2-macroglobuline
- AMP : adenosine monophosphate
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ADP : adénosine diphosphate
- ARN : acide ribonucléique
- ATP : adénosine triphosphate

C

- C4BP : C4b-binding protein
- CalDAG-GEFI : diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor I
- CAT : Calibrated Automated Thrombogram

E

- EGF : epidermal growth factor
- EPCR : endothelial protein C receptor
- ETP : potentiel endogène de thrombine

F

- FMD : flow-mediated dilation

G

- GDP : guanosine diphosphate
- GTP : guanosine triphosphate

H

- HBS : heparin binding site
- HUVEC : human umbilical vein endothelial cells

I

- ISTH : International Society on Thrombosis and Haemostasis
- ITAM : immunoreceptor tyrosine-based motif

N

- NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- NF- κ B : nuclear factor-kappa B
- NO : nitric oxide
- Nrf2 : nuclear factor erythroid 2 related factor
- NTA : nanoparticle tracking analysis

P

- PAI : plasminogen activator inhibitor
- PAR : protease-activated receptor
- PFA : Platelet Function Analyzer
- PIVKA : protein induced by vitamin K absence
- PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1

R

- Récepteur TP : thromboxane prostanoloïde
- RFM : ring fission metabolites

S

- SREM : structurally related epicatechin metabolites
- Serpine : serin protease inhibitor

T

- TAFI : thrombin-activable fibrinolysis inhibitor
- TCA : temps de céphaline avec activateur
- TFPI : tissue factor pathway inhibitor
- TNF : tumor necrosis factor
- tPA : tissue plasminogen activator
- TQ : temps de Quick
- TRAP : thrombin receptor activator peptide

Table des matières

INTRODUCTION.....	15
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
1. Physiologie et exploration de l'hémostase.....	17
1.1 Physiologie de l'hémostase primaire.....	18
1.1.1 Les différents acteurs de l'hémostase primaire.....	18
1.1.2 Le processus d'hémostase primaire.....	23
1.1.3 Les différentes voies d'activation plaquettaire.....	26
1.2 Exploration de l'hémostase primaire.....	29
1.3 Physiologie de la coagulation plasmatique.....	31
1.3.1 Les facteurs vitamine K dépendants.....	31
1.3.2 La cascade de la coagulation.....	32
1.3.3 Les inhibiteurs physiologiques de la coagulation.....	35
1.3.4 Le modèle cellulaire de la coagulation <i>in vivo</i>	39
1.3.5 La fibrinof ormation.....	41
1.4 Exploration de la coagulation plasmatique.....	43
1.4.1 Les tests classiques d'exploration de la coagulation plasmatique.....	43
1.4.2 Les tests globaux d'exploration de la coagulation plasmatique.....	46
1.5 Les microparticules.....	52
1.5.1 La formation des microparticules.....	52
1.5.2 Les propriétés des microparticules.....	54
1.5.3 Le rôle des microparticules dans l'hémostase.....	54
1.6 Exploration des microparticules.....	57
1.6.1 La cytométrie en flux et autres techniques de caractérisation cellulaire.....	57
1.6.2 Les tests fonctionnels.....	58
1.7 Physiologie de la fibrinolyse.....	59
1.7.1 les facteurs profibrinolytiques.....	60

1.7.2 Les inhibiteurs physiologiques de la fibrinolyse.....	61
1.8 Exploration de la fibrinolyse.....	63
2. L'épicatéchine.....	65
2.1 Classification et structure.....	65
2.2 Flavan-3-ols : aliments sources et niveau de consommation.....	68
2.3 Biodisponibilité et métabolisme.....	69
2.4 Propriétés biologiques.....	74
2.5 Rôles sur l'hémostase.....	75
2.5.1 Impact de l'épicatéchine sur l'hémostase primaire.....	76
2.5.2 Impact de l'épicatéchine sur la coagulation plasmatique.....	78
2.5.3 Impact de l'épicatéchine sur les microparticules.....	81
2.5.4 Impact de l'épicatéchine sur la fibrinolyse.....	83
OBJECTIFS.....	85
RESULTATS.....	86
Publication n°1.....	86
Publication n°2.....	96
Publication n°3.....	111
DISCUSSION.....	120
REFERENCES.....	135

Liste des figures

Figure 1 : Hémostase primaire, coagulation plasmatique et fibrinolyse, les trois principales étapes de l'hémostase.

Figure 2 : Schéma de la structure des vaisseaux

Figure 3 : Schéma d'une cellule endothéliale

Figure 4 : Schéma d'une plaquette

Figure 5 : Représentation de la structure du facteur de Willebrand et de ses différents domaines

Figure 6 : représentation schématique du processus d'hémostase primaire

Figure 7 : Récepteurs et voies de signalisation plaquettaire

Figure 8 : Cibles des principaux inhibiteurs physiologiques de la coagulation plasmatique

Figure 9 : Schéma du système protéine C / protéine S

Figure 10 : Schéma de la coagulation plasmatique intégrant la composante cellulaire

Figure 11 : Différentes phases de la coagulation plasmatique en regard de la génération de thrombine

Figure 12 : Structure du fibrinogène

Figure 13 : Exploration de la coagulation plasmatique par les tests classiques

Figure 14 : Principaux paramètres du test de génération de thrombine

Figure 15 : Tracés du test de génération de thrombine

Figure 16 : Mécanisme de vésiculation des microparticules

Figure 17 : Processus de fibrinolyse

Figure 18 : Classification des polyphénols

Figure 19 : Les différentes classes de flavonoïdes

Figure 20 : Les différentes catéchines

Figure 21 : Représentation schématique de l'absorption et du métabolisme des polyphénols

Figure 22 : Principaux métabolites retrouvés dans la circulation après ingestion d'épicatéchine

Figure 23 : Diagramme des interactions de l'épicatéchine avec les résidus de la thrombine

Figure 24 : Préparation des échantillons pour l'analyse des microparticules en cytométrie en flux

Figure 25 : Impact de l'épicatéchine sur la génération de thrombine réalisée sur ST-Genesia

Liste des tableaux

Tableau 1 : Méthodologie et résultats des tests d'agrégation plaquettaire utilisés pour évaluer l'impact des flavonoïdes et de l'épicatéchine.

INTRODUCTION

L'alimentation joue un rôle prépondérant dans le domaine de la santé et notamment vis-à-vis de la survenue des maladies chroniques non transmissibles. Le projet *Global Burden Disease* ("Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019," 2020) dont le but est d'étudier l'état de santé au niveau mondial à travers des données telles que les causes de décès, d'incapacité et les facteurs de risque a permis d'imputer aux facteurs de risque alimentaire près de 11 millions de morts en 2017 soit un décès sur 5. Une alimentation non optimale serait le premier facteur de risque vis à vis des maladies non transmissibles telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers ou le diabète. Il apparait que les aliments considérés comme nocifs pour la santé sont surconsommés alors que les apports en aliments sains sont sous optimaux. Parmi ces derniers, le projet pointe notamment des niveaux de consommation insuffisants en produits végétaux tels que les fruits et légumes, les noix ou encore les céréales complètes.

D'une façon générale, en plus de leurs apports intéressants en vitamines, minéraux et fibres, ces aliments sont aussi des sources abondantes et exclusives d'une grande diversité de composés bioactifs qui selon leur structure chimique peuvent être répartis en plusieurs grandes familles. Ainsi, les catégories de bioactifs végétaux les plus répandus dans les produits végétaux incluent les familles des polyphénols, caroténoïdes, glucosinolates, thiosulfates. Pour certaines, ces familles sont retrouvées spécifiquement dans certaines catégories d'aliments (ex : glucosinolates dans les crucifères ou thiosulfates dans l'ail), tandis que d'autres sont plus ubiquitaires, ce qui est notamment le cas des polyphénols qui par ailleurs sont aussi les bioactifs majeurs de notre alimentation. Selon leur structure de base, les polyphénols sont répartis en différentes classes dont les plus importantes en termes d'apports alimentaires sont celles des acides phénoliques et des flavonoïdes. Différentes preuves (épidémiologiques, cliniques et mécanistiques) de leurs rôles bénéfiques dans la santé humaine s'accumulent depuis plusieurs années, notamment en ce qui concerne l'intérêt des flavonoïdes dans la prévention des maladies cardiométaboliques (maladies cardiovasculaires, diabète type 2, obésité), du déclin cognitif et de certains cancers. Les flavonoïdes présentent un large spectre d'activités biologiques (antioxydantes, anti-

inflammatoires, anti-hypertensives, anti-athérogéniques, anti-angiogéniques, antiprolifératives ...) qui pourraient expliquer leur effets bénéfiques pour la santé. Néanmoins, l'impact de ces molécules sur le processus d'hémostase mérite encore d'être approfondi, au regard son implication dans la physiopathologie des maladies.

L'objectif de mon travail a été d'étudier l'impact de l'épicatéchine, un flavonoïde appartenant au groupe des flavan-3-ols retrouvé notamment dans le cacao, le chocolat noir, le thé ou les pommes, sur le processus d'hémostase. Dans une première partie nous avons orienté la recherche sur la définition d'un phénotype pour les 3 principales étapes de l'hémostase : l'hémostase primaire, la coagulation plasmatique et la fibrinolyse en travaillant avec des outils globaux pour intégrer la majorité des effecteurs de ces phénomènes et refléter des variations complexes. Dans une deuxième partie nous nous sommes intéressés à l'impact de l'épicatéchine sur un facteur émergeant en hémostase, les microparticules, qui jouent un rôle prépondérant dans les maladies non transmissibles telles que les maladies cardiovasculaires et cela à travers trois axes. Nous avons étudié le rôle de l'épicatéchine sur la formation des microparticules, sur leur phénotype et enfin sur leurs propriétés fonctionnelles procoagulantes. Dans une dernière partie nous avons entrepris de déterminer l'impact de l'épicatéchine sur la finalité du processus d'hémostase, le caillot de fibrine et notamment sa structure et les propriétés mécaniques qui en découlent.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Physiologie et exploration de l'hémostase

L'hémostase correspond à l'ensemble des mécanismes biologiques mis en jeu pour empêcher l'extravasation du sang en cas de brèche vasculaire. Elle permet la formation d'un caillot au niveau des vaisseaux qui vient obstruer la brèche et stopper l'hémorragie. L'hémostase est également le processus permettant d'éviter les thromboses, définies comme la formation de caillots, responsables notamment de pathologies cardiovasculaires (accident vasculaire cérébral, thrombose veineuse profonde par exemple). Différents acteurs sont impliqués tout au long d'un processus découpé en 3 phases connexes (Figure 1). Tout d'abord l'hémostase primaire permet d'obstruer la brèche grâce au clou plaquettaire. La coagulation plasmatique permet ensuite de consolider le clou plaquettaire grâce à la formation d'un réseau de fibrine. Enfin la fibrinolyse permet la lyse du caillot pour limiter l'extension du thrombus, et la reperméabilisation des vaisseaux.

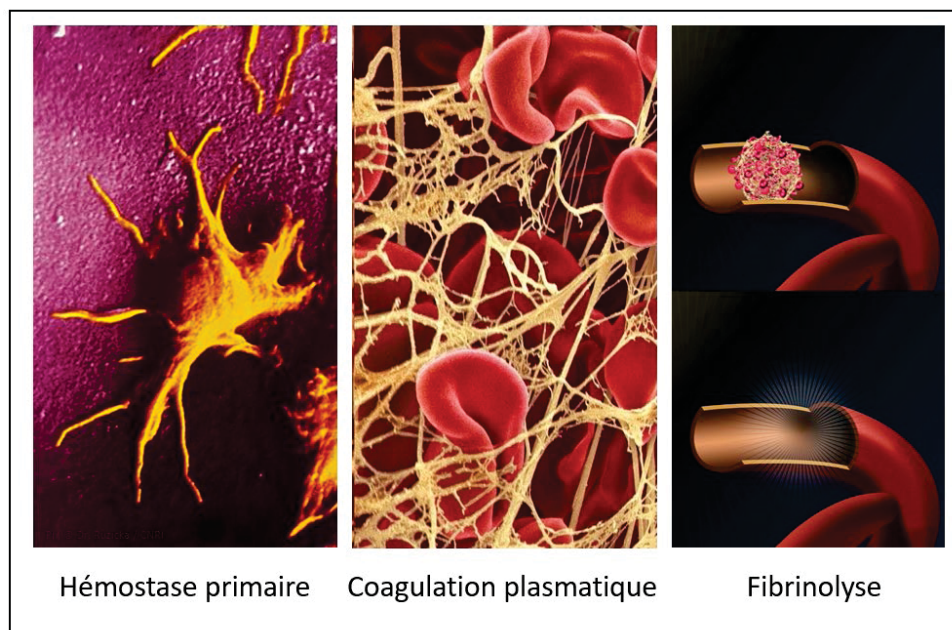


Figure 1 : Hémostase primaire, coagulation plasmatique et fibrinolyse, les trois principales étapes de l'hémostase

1.1 Physiologie de l'hémostase primaire

L'hémostase primaire correspond à l'ensemble des phénomènes survenant sur le site de la lésion vasculaire et aboutissant à la formation d'un clou plaquettaire ou thrombus blanc. Elle fait intervenir différents types d'acteurs : les éléments cellulaires tels que la paroi vasculaire et les plaquettes, des éléments plasmatiques comme le facteur de Willebrand et le fibrinogène et enfin un facteur mécanique, les forces de cisaillement.

1.1.1 Les différents acteurs de l'hémostase primaire

La paroi vasculaire est organisée de l'extérieur vers l'intérieur selon 3 tuniques ; la tunique externe ou adventice est constituée essentiellement de tissu conjonctif et est riche en collagène et en fibres élastiques. La média est constituée de cellules musculaires lisses. Enfin l'intima, en contact avec le sang, possède une couche de cellules endothéliales à la surface et du tissu conjonctif fibroélastique (Cohen, 1997; Stevens and Lowe, 2002) (Figure 2).

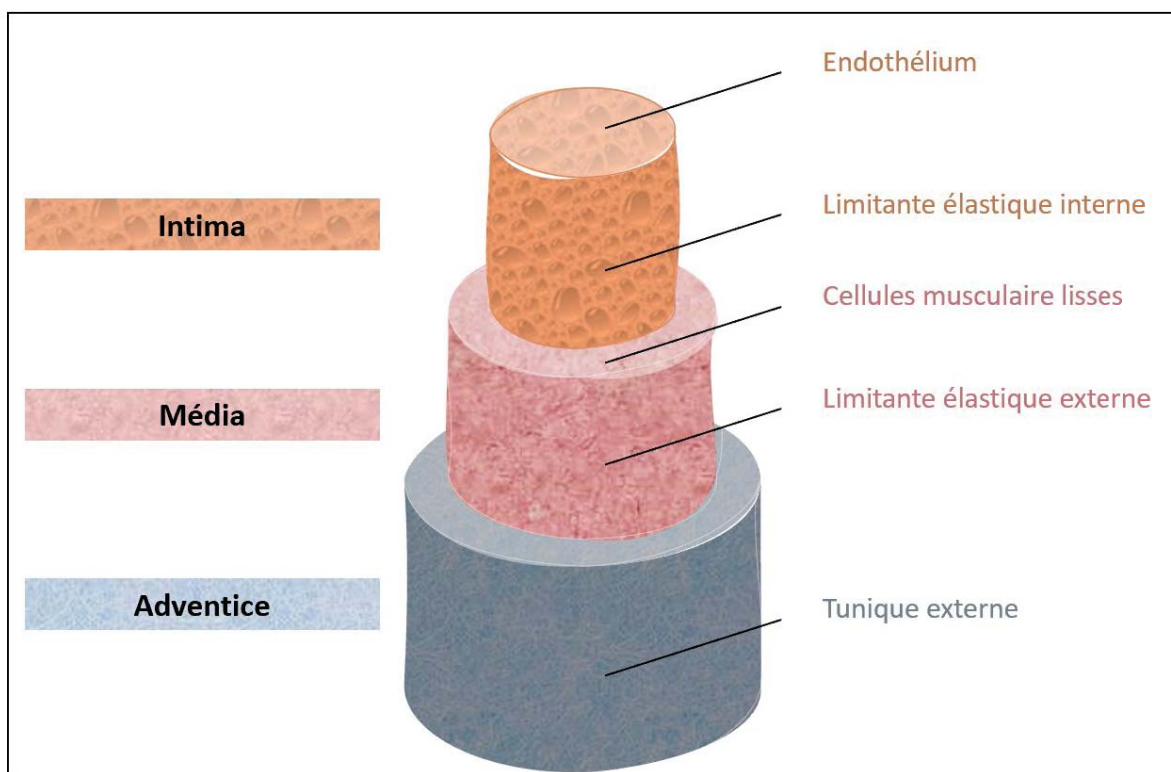


Figure 2 : Schéma de la structure des vaisseaux

L'endothélium est l'organe le plus largement distribué dans l'organisme et s'il présente une structure et des propriétés hétérogènes selon les territoires, il fournit une surface antiagrégante et anticoagulante en contact avec le sang. Il joue un rôle central dans la régulation de l'hémostase, notamment en synthétisant et libérant dans la circulation différents agents hémostatiques. Il sécrète le monoxyde d'azote et la prostacycline agissant comme agents vasodilatateurs et antiagrégants. Le facteur de Willebrand est principalement synthétisé par les cellules endothéliales et stocké dans les corps de Weibel-Palade.

L'endothélium participe également à la coagulation plasmatique avec selon les stimulations l'expression de facteur tissulaire d'un côté et la modulation des systèmes anticoagulants physiologiques tels que le système protéine C / protéine S, l'antithrombine ou le TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*). L'endothélium intervient également dans le processus de fibrinolyse en synthétisant notamment le tPA (tissue Plasminogen Activator) ou le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1). Le sous-endothélium est lui composé de tissu conjonctif avec du collagène, de la fibronectine et des fibres musculaires lisses. A l'inverse de l'endothélium, il présente des propriétés thrombogènes permettant lors de la mise en contact avec le sang la mise en jeu du processus hémostatique avec notamment l'adhésion des plaquettes (Aird, 2015; Verhamme and Hoylaerts, 2006) (Figure 3).

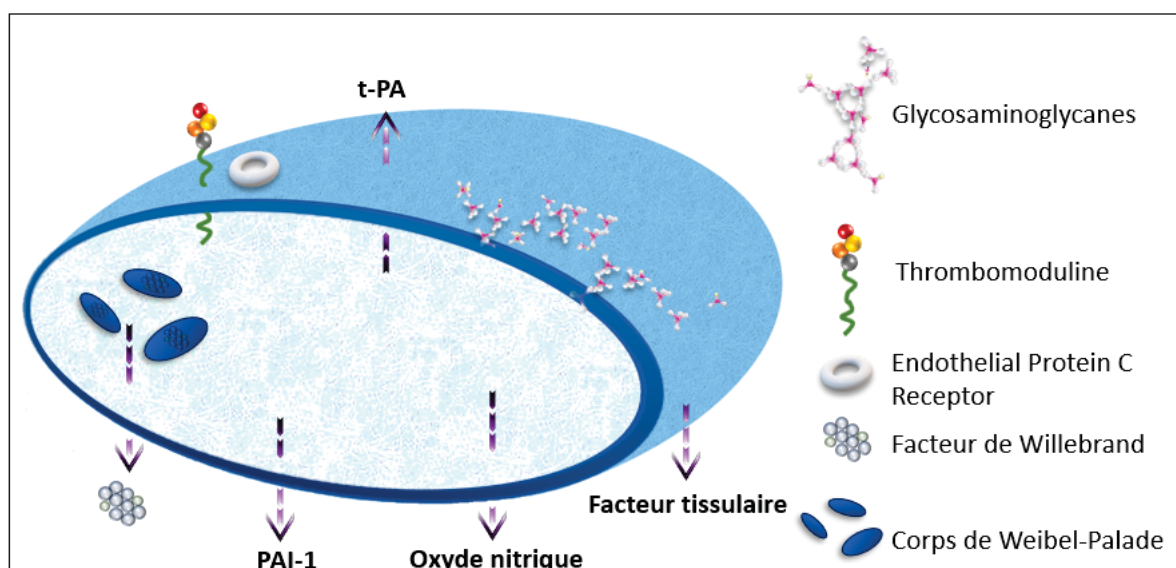


Figure 3 : Schéma d'une cellule endothéliale

Les plaquettes sont des cellules sanguines anucléées de petite taille (2-4 μm) formées dans la moelle osseuse à partir de la fragmentation cytoplasmique des mégacaryocytes. Leur durée de vie s'étend de 7 à 10 jours, elles circulent dans le sang à une concentration allant de 150 à 400 G/L ; Elles sont également stockées dans la rate et le foie ou elles sont éliminées par les hépatocytes ou les macrophages (Quach et al., 2018; van der Meijden and Heemskerk, 2019). La structure des plaquettes est complexe et s'articule autour de la membrane plasmique constituée d'une bicouche phospholipidique asymétrique (Lhermusier et al., 2011). Le feuillet interne composé notamment de phosphatidylsérine et de phosphatidylinositol permet de maintenir la stabilité de la plaquette en phase de repos (Ghoshal and Bhattacharyya, 2014).

Cette asymétrie est maintenue grâce à différents types d'enzyme permettant le transport de phospholipides du feuillet interne au feuillet externe. Ces enzymes sont les flippases et floppases, enzymes à ATP (adénosine triphosphate), ainsi que la scramblase dont la fonction est dépendante de la concentration intraplaquettaire en calcium. Elle permet d'externaliser la phosphatidylsérine normalement séquestrée au sein du feuillet interne, à la surface de la plaquette (Heemskerk et al., 2002; Nagata et al., 2020, 2016; Suzuki and Nagata, 2014).

Les différentes capacités fonctionnelles des plaquettes font également intervenir une large variété de glycoprotéines insérées dans la membrane plasmique. Les principales sont la glycoprotéine Ib qui permet aux plaquettes d'adhérer au sous-endothélium par l'intermédiaire du facteur de Willebrand, la glycoprotéine VI qui permet l'adhésion au collagène et l'activation des plaquettes et la glycoprotéine IIb-IIIa qui permet l'agrégation plaquettaire (Gremmel et al., 2016).

Le système canaliculaire ouvert forme un réseau à l'intérieur de la cellule formé à partir d'invagination de la membrane plasmique. Il constitue une interface importante de communication avec l'extérieur, permet la libération du contenu intraplaquettaire et forme une réserve de phospholipides disponibles lors de l'activation des plaquettes (Behnke and Forer, 1998).

Le cytoplasme des plaquettes comprend notamment des mitochondries et des organelles de sécrétions, les lysosomes et les granules. Les plus abondantes sont les granules alpha qui contiennent des protéines membranaires, des facteurs de la coagulation, du facteur de Willebrand (Harrison and Cramer, 1993). Les granules denses contiennent des molécules non protéiques tels que l'adénosine diphosphate (ADP), l'ATP et le calcium (McNicol and Israels, 1999) (Figure 4).

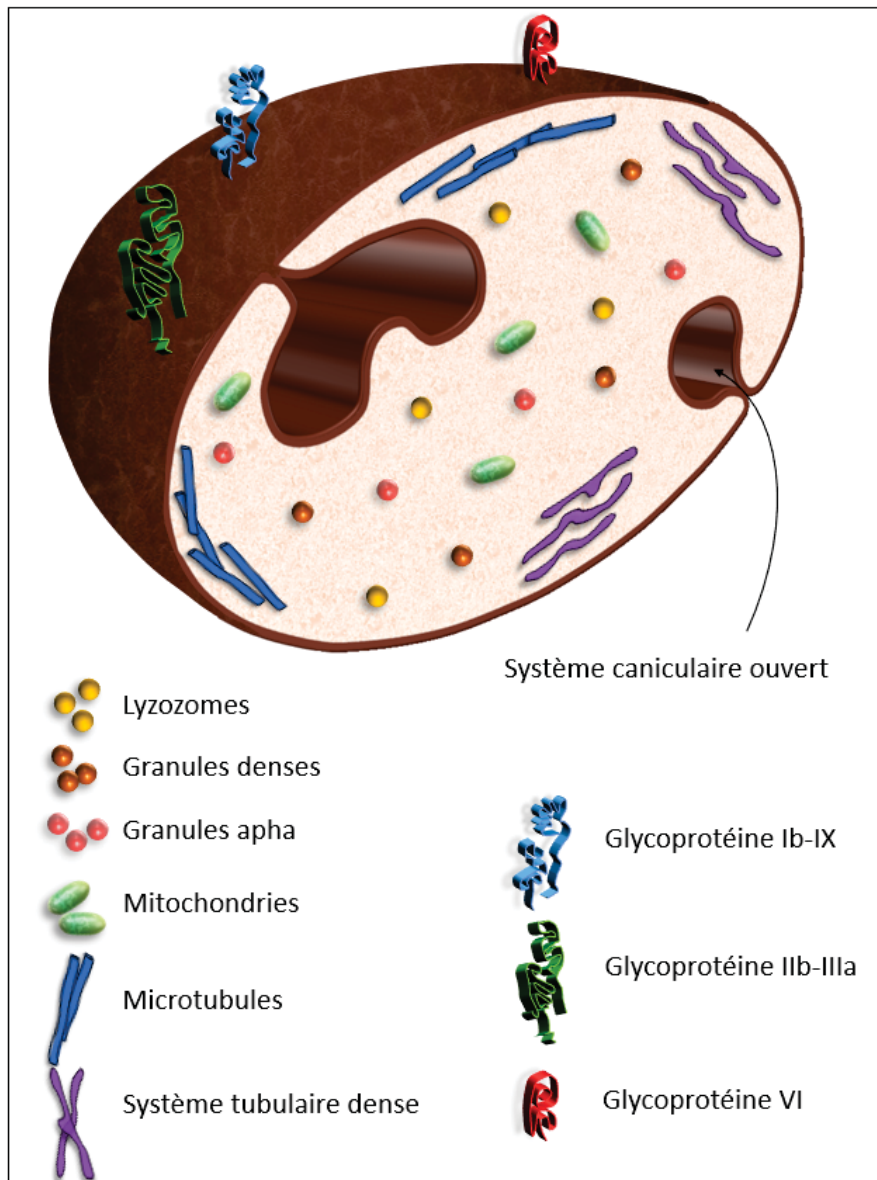


Figure 4 : Schéma d'une plaquette

Le facteur de Willebrand est synthétisé par les mégacaryocytes et cellules endothéliales et stocké respectivement dans les granules alpha et dans les corps de Weibel-Palade (Sporn et al., 1985; Wagner et al., 1982). Il est synthétisé sous forme de pré-pro-peptide. Une fois adressé dans le réticulum endoplasmique le facteur de Willebrand s'assemble sous forme de dimères puis de multimères (Bryckaert et al., 2015). Le facteur de Willebrand est principalement éliminé par les macrophages du foie et de la rate (van Schooten et al., 2008).

Dans la circulation sanguine, dans des conditions de flux laminaire, le facteur de Willebrand circule sous une forme globulaire peu affiné pour les plaquettes.

Lorsque le flux devient turbulent le facteur de Willebrand s'active, sa conformation est modifiée exposant ses principaux domaines. Les domaines A1 et A3 permettent la liaison au collagène (Bonney et al., 2006) alors que le domaine A1 se lie à la glycoprotéine Ib plaquettaire (Löf et al., 2018). Le facteur de Willebrand intervient indirectement dans l'étape de coagulation plasmatique en tant que protéine de transport du facteur VIII (Figure 5).

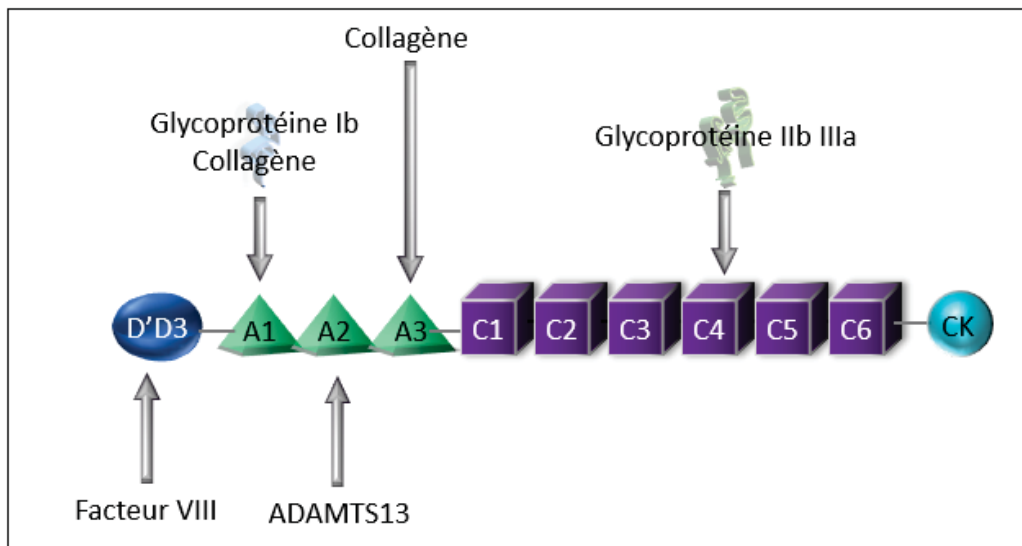


Figure 5 : Représentation de la structure du facteur de Willebrand et de ses différents domaines

Les différentes étapes de l'hémostase primaire sont également impactées par la rhéologie du flux sanguin à travers notamment la contrainte de cisaillement. Celle-ci s'exerce parallèlement au vaisseau et dépend de la viscosité du sang, du diamètre du vaisseau et du débit. Des contraintes de cisaillement élevées telles qu'observé en cas de rupture du flux sanguin entraînent le dépliement du facteur de Willebrand exposant différents domaines (Di Stasio and De Cristofaro, 2010). Le fibrinogène est synthétisé par le foie en tant que protéine homodimérique de 340 kDaltons. Il est synthétisé par le foie, circule à une concentration de 2 à 4 g/L et peut être internalisé dans les granules alpha des plaquettes par endocytose (Vilar et al., 2020; Wolberg, 2007). Le fibrinogène se compose de 2 domaines D externes reliés par un domaine E central. Il est formé de 3 chaînes polypeptidiques A α , B β et γ reliées par des ponts disulfures au sein du domaine E (Mosesson, 2005). Outre son rôle dans la coagulation, le fibrinogène est l'élément clé de l'étape finale de l'hémostase primaire, l'agrégation plaquettaire. En effet, c'est un ligand à haute

affinité de la glycoprotéine plaquettaire IIb-IIIa permettant la formation de ponts interplaquettaires nécessaires à la formation du clou plaquettaire (Bennett, 2001).

1.1.2 Le processus d'hémostase primaire

L'hémostase primaire s'articule autour de 2 temps. Le premier très court, le temps vasculaire, résulte en une vasoconstriction réflexe et transitoire grâce à l'élasticité de la paroi vasculaire. Elle permet de diminuer le flux sanguin aux abords de la brèche vasculaire et la perte sanguine, et favorise les interactions plaquettes/sous endothélium. Ce phénomène est soutenu et prolongé par la libération à partir des cellules endothéliales et des plaquettes de molécules vasoconstrictrices telles que le thromboxane A₂, l'endothéline ou la sérotonine (Figure 6).

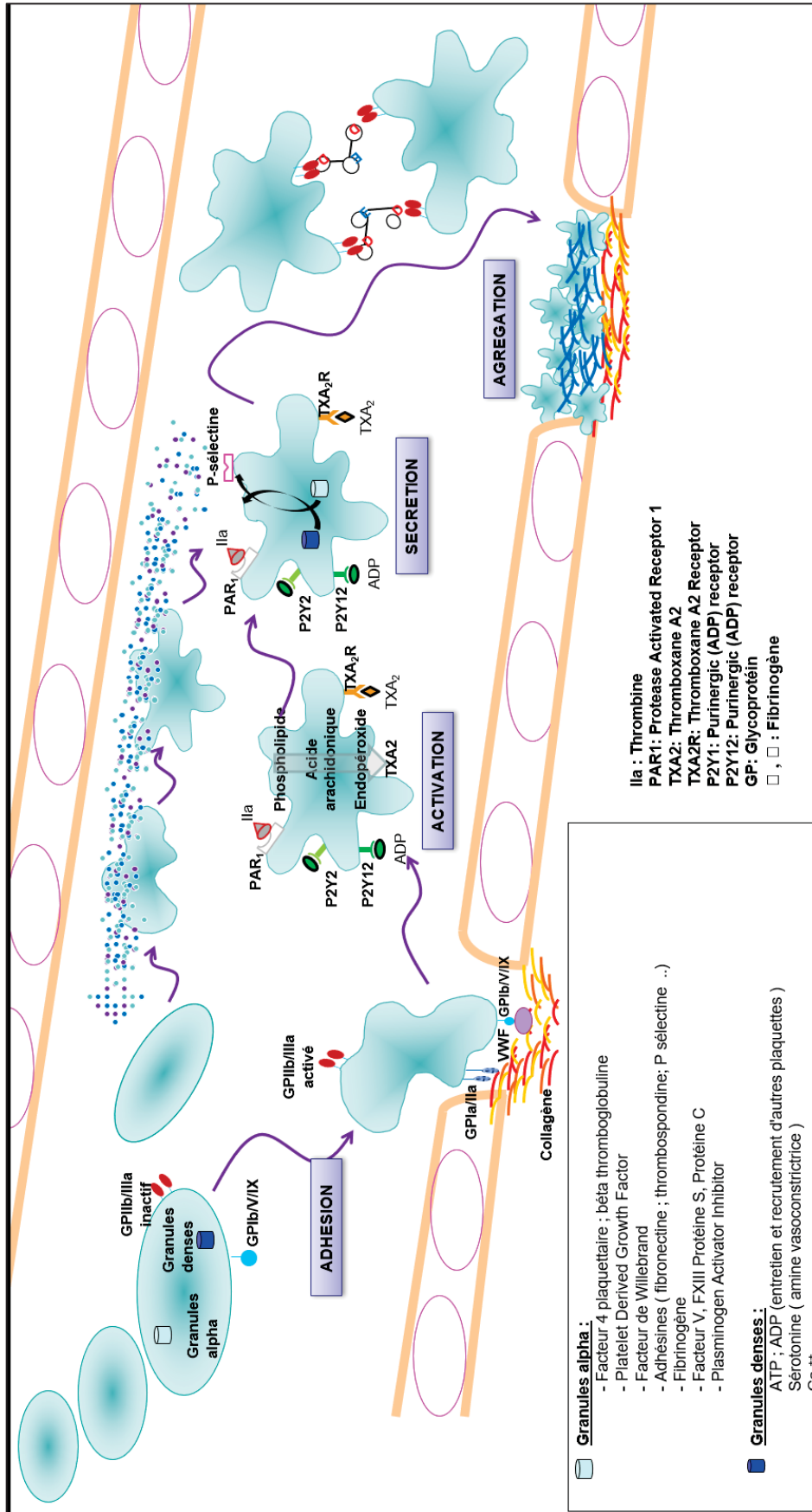


Figure 6 : représentation schématique du processus d'hémostase primaire

Survient ensuite le temps plaquettaire. La brèche vasculaire expose le sous endothélium vasculaire, thrombogène, au flux sanguin. En cas de contraintes de cisaillement élevées, comme c'est le cas dans les artérioles et les artères de faible calibre l'adhésion des plaquettes au collagène du sous endothélium est réalisée grâce au facteur de Willebrand qui se lie à la glycoprotéine Ib (Ruggeri et al., 2006; Savage et al., 1998). En cas de contraintes de cisaillement plus faible cette interaction, insuffisante pour engendrer une adhésion stable, entraîne un phénomène de roulement des plaquettes, renforcé par le système sélectine P / PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) (Coenen et al., 2017). Les plaquettes vont pouvoir lier le collagène du sous-endothélium par différentes glycoprotéines dont la glycoprotéine VI et la glycoprotéine Ia-IIa, phénomène qui va initier un signal intracellulaire d'activation des plaquettes (Watson et al., 2000). Cela va entraîner le relargage d'agonistes plaquettaires tels que le thromboxane A2 ou l'ADP ainsi qu'une augmentation de l'affinité des intégrines plaquettaires pour les constituants du sous-endothélium (Hynes, 2002; Ruggeri, 2009; Varga-Szabo et al., 2008). Il est également observé une activation de la glycoprotéine IIb-IIIa ainsi qu'un changement de forme des plaquettes qui vont émettre des pseudopodes afin de favoriser la fixation au niveau de la brèche vasculaire (Ruggeri and Mendolicchio, 2007). Ces différents mécanismes associés à la présence de thrombine capable de se lier à la glycoprotéine Ib (Ruggeri et al., 2010) vont permettre d'amplifier l'activation plaquettaire. Les plaquettes vont libérer le contenu de leurs granules riches en substances proagrégantes et procoagulantes, par fusion avec la membrane plasmique (Golebiewska and Poole, 2015; Joshi and Whiteheart, 2017). Ces molécules telles que l'ADP vont engendrer un rétrocontrôle positif sur les plaquettes circulantes et permettre l'initiation du processus d'agrégation plaquettaire, notamment, via les signaux « inside-out » d'activation de la glycoprotéine IIb-IIIa (Andre et al., 2003) Le fibrinogène va ensuite par ses domaines D former des ponts entre les plaquettes en liant la glycoprotéine IIb-IIIa (Furie and Furie, 2007). Par ailleurs, la fixation des ligands de la glycoprotéine IIb-IIIa va mettre en jeu via les signaux « outside-in » des mécanismes influant sur l'étalement des plaquettes, la stabilité ou la rétractation du caillot (Coller and Shattil, 2008). Ces processus vont permettre de contrôler l'hémorragie au niveau de la brèche vasculaire par formation du clou plaquettaire qui sera consolidé par l'étape de coagulation plasmatique.

1.1.3 Les différentes voies d'activation plaquettaire

Les mécanismes d'activation plaquettaire sont complexes intégrant notamment des molécules d'adhésion (facteur de Willebrand, collagène, laminines, fibronectine...) et des activateurs solubles (ADP, thrombine, thromboxane A2...) (Figure 7).

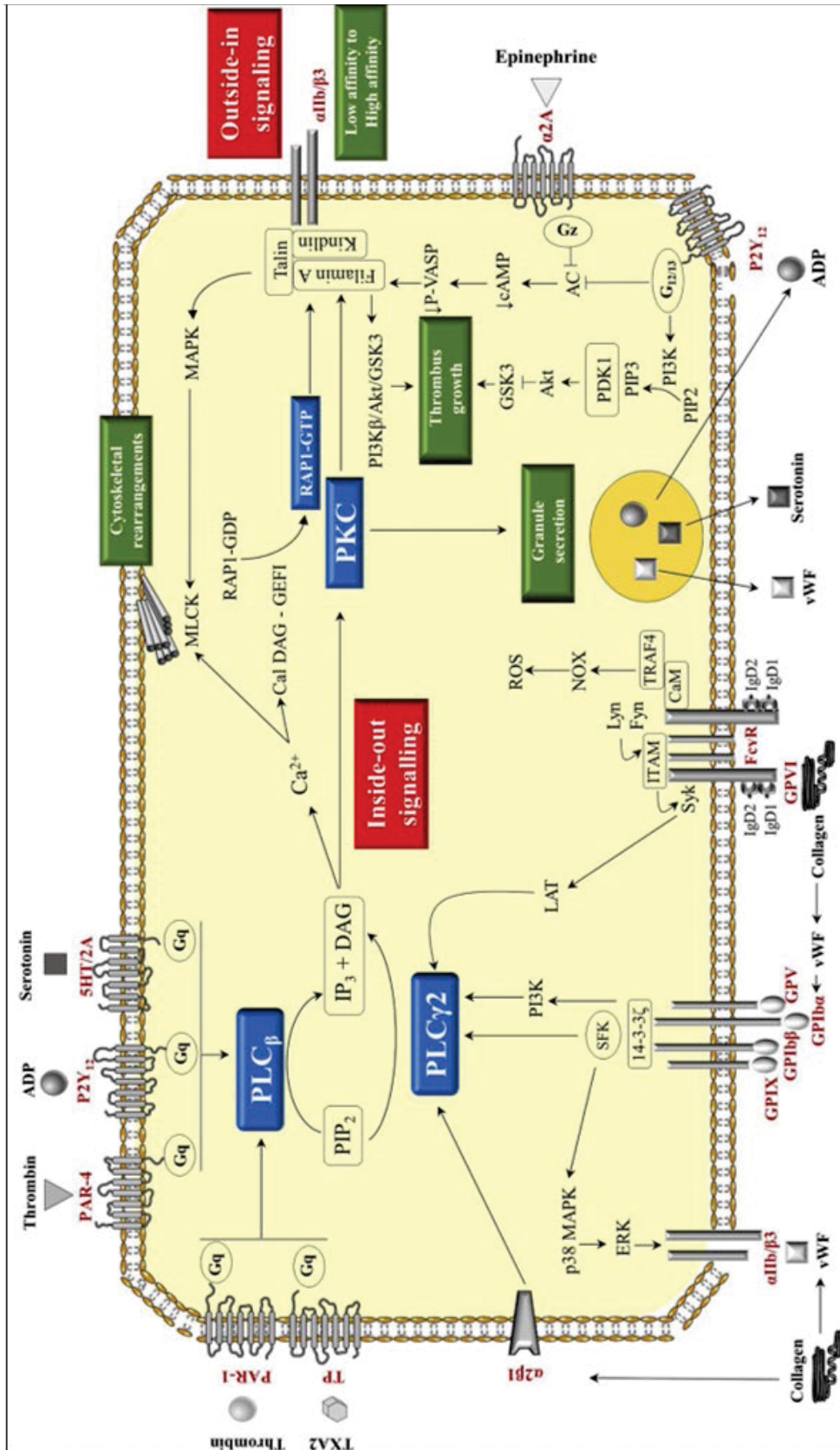


Figure 7 : Récepteurs et voies de signalisation plaquettaire

D'après Vilahur, G., Gutiérrez, M., Arzanauskaite, M., Mendieta, G., Ben-Aicha, S., & Badimon, L. (2018). *Intracellular platelet signalling as a target for drug development. Vascular Pharmacology.*

L'exposition du collagène met en jeu différents récepteurs menant à l'adhésion plaquettaire, tels la glycoprotéine Ib-IX-V qui va permettre la liaison au facteur de Willebrand. Cela engendre un signal de transduction impliquant les protéines kinase Src, l'activation de phospholipase C, la production de diacylglycérol et l'activation de protéines kinase C. La liaison forte du collagène à la glycoprotéine VI entraîne également l'activation plaquettaire par la voie de signalisation ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based motif) qui induirait notamment l'activation de phospholipase C (Gibbins, 2004; Scharf, 2018). Il existe plusieurs isoformes de phospholipase C et au niveau plaquettaire notamment la forme β et la forme $\gamma 2$. Si la phospholipase β intervient suite à la mobilisation par des agonistes solubles, la phospholipase $\gamma 2$ est sous la dépendance de protéines kinases liées aux glycoprotéines Ib-IX-V ou VI (Vilahur et al., 2018). L'activation des phospholipases C entraîne à partir de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate la formation d'inositol triphosphate et de diacylglycérol. L'inositol triphosphate se lie à ces récepteurs du système tubulaire dense entraînant la mobilisation du calcium intraplaquettaire. Le diacylglycérol quant à lui active les protéine kinase C à l'origine de la dégranulation plaquettaire et de l'activation des intégrines (Bye et al., 2016; Harper and Poole, 2010; Stefanini and Bergmeier, 2018). L'augmentation du calcium intracellulaire entraîne le recrutement du facteur d'échange guanine GDP/GTP, CalDAG-GEFI (Stefanini and Bergmeier, 2010). Celui-ci va activer la GTPase Rap1 ce qui aboutit au recrutement de la taline et de la kindline à l'origine de l'activation de la glycoprotéine IIb-IIIa indispensable à l'agrégation plaquettaire (Stefanini and Bergmeier, 2019, 2018).

Schématiquement, les récepteurs des agonistes solubles appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G dont l'activation induit l'activité enzymatique de la phospholipase C, l'adénylate cyclase, la phosphoinositide 3-kinase et de GTPases.

L'ADP possède 2 types de récepteurs purinergiques P2Y1 et P2Y12. P2Y1, couplé à la protéine Gq, entraîne l'activation de la phospholipases C β à l'origine de la mobilisation du calcium intraplaquettaire et de l'activation des protéines kinases C. P2Y12, couplé à la protéine Gi2, exerce un contrôle sur la formation d'AMP cyclique en inhibant l'adénylate cyclase. Ce récepteur est également capable

d'activer la phosphoinositide 3-kinase et la GTPase Rap1 (Cattaneo, 2015; Woulfe et al., 2002).

La thrombine, le plus puissant des agonistes plaquettaires, possède 2 récepteurs PAR1 et PAR4 (*Protease activated receptor*), couplés aux protéines Gq et G12/13. Les peptides activateurs de 6 acides aminés proviennent des récepteurs eux-mêmes, après clivage par la thrombine. Ils correspondent au TRAP (*Thrombin Receptor Activator Peptide*) souvent utilisé comme agoniste lors du test d'agrégation plaquettaire. L'activation des récepteurs PAR entraîne la sécrétion par les plaquettes du contenu granulaire libérant notamment de l'ADP et l'activation de la phospholipase C. Cette activation est un évènement majeur amenant au clivage du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en diacylglycérol puis à l'activation de la protéine kinase C (Coughlin, 2005).

L'acide arachidonique qui est clivé lors de l'activation plaquettaire par la phospholipase A2 délivre des endopéroxydes sous l'action de la cyclooxygénase. Ces endopéroxydes peuvent être transformés en thromboxane A2 par la thromboxane synthétase plaquettaire ou être utilisés dans les cellules endothéliales voisines en tant que substrat de la prostacycline synthétase. Le thromboxane A2 entraîne une vasoconstriction et une activation plaquettaire après liaison aux récepteurs TP (thromboxane prostanoid) couplés aux protéines Gq et G12/13. Leur mise en jeu est à l'origine de la mobilisation du calcium intraplaquettaire et de l'activation de la GTPase RhoA engendrant la contraction et la déformation des plaquettes (Braune et al., 2020; Bye et al., 2016).

1.2 Exploration de l'hémostase primaire

Le diagnostic d'un syndrome hémorragique repose en premier lieu sur un interrogatoire précis et un examen clinique puis le cas échéant sur l'exploration de l'hémostase primaire. Il existe des tests globaux et des dosages plus spécifiques s'articulant autour des principaux acteurs de l'hémostase primaire, que sont par exemple les plaquettes ou le facteur de Willebrand.

En raison de sa faible performance, la réalisation du temps de saignement n'est plus recommandé (Lehman et al., 2001; Lind, 1991). Le *Platelet Function Analyzer (PFA-100/200)* présenté comme une alternative au temps de saignement au

regard de ses performances jugées supérieures ne s'est pas imposé comme un test de dépistage fiable. En effet, le PFA manque de sensibilité dans la détection des thrombopathies (à l'exclusion des formes sévères telles que la maladie de Bernard-Soulier ou la thrombasthénie de Glanzmann) ainsi que dans la maladie de Willebrand (Hayward et al., 2006; Nichols et al., 2008).

Le diagnostic d'une maladie de Willebrand repose dans un premier temps sur les dosages spécifiques du facteur de Willebrand par détermination de l'activité cofacteur de la ristocétine et antigène. L'activité fonctionnelle mesurée par agrégamétrie ou chimiluminescence évalue la capacité du facteur de Willebrand à lier les plaquettes ou la glycoprotéine Ib généralement en présence de ristocétine. Ces analyses permettent généralement d'objectiver un déficit. La détermination précise du type de maladies de Willebrand, quantitative type I ou III et qualitative type II (et sous types) réalisée en seconde intention allie des tests plus spécialisés tels que l'analyse génétique, l'étude de la répartition des multimères du facteurs de Willebrand ou l'étude de sa liaison à la glycoprotéine Ib (De Jong and Eikenboom, 2016; Just, 2017; Leebeek and Eikenboom, 2016).

L'exploration des plaquettes associe la numération plaquettaire et frottis sanguin permettant de détecter une thrombopénie et les anomalies de taille et structure. Le diagnostic des thrombopathies repose en partie sur le test d'agrégation plaquettaire. Considéré comme le *gold standard*, ce test souffrait néanmoins d'un manque de standardisation rendant la réalisation, l'interprétation et la comparaison des résultats compliquée. Ces dernières années le test d'agrégation plaquettaire tend à se standardiser du fait de recommandations de comités d'experts et des centres de compétences tant sur la méthodologie que dans l'interprétation (Cattaneo et al., 2013; Gresele and Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on Thrombosis and Hemostasis, 2015; Mezzano and Quiroga, 2019). Le test d'agrégation plaquettaire repose sur la mesure de la transmission de la lumière. Un plasma riche en plaquettes est utilisé pour mesurer l'agrégation plaquettaire en réponse à différents agonistes (Hvas and Favaloro, 2017). Ces agonistes vont se fixer sur les récepteurs plaquettaires ou nécessiter une conversion enzymatique comme pour l'acide arachidonique afin d'activer les plaquettes. Différents types d'agonistes sont testés. Les agonistes forts permettent une sécrétion et une agrégation plaquettaire simultanée. Les agonistes faibles (ou les agonistes forts à faible concentration) initient le

phénomène d'agrégation qui sera amplifié par le relargage granulaire d'ADP et le thromboxane A2 (Alessi et al., 2020; Cattaneo, 2009).

A ces tests de première intention sont généralement associés dans un second temps des tests plus spécialisés permettant notamment de mettre en évidence le relargage des granules plaquettaires ou la composition en glycoprotéines à la surface des plaquettes par cytométrie en flux (Gresele et al., 2016; Gresele and Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on Thrombosis and Hemostasis, 2015).

1.3 Physiologie de la coagulation plasmatique

Le clou plaquettaire formé à la suite du processus d'hémostase primaire doit être consolidé, c'est l'objectif de la phase de coagulation plasmatique. La coagulation plasmatique regroupe tous les phénomènes permettant de former le caillot de fibrine qui stoppera définitivement le saignement. Elle comprend une succession de réactions enzymatiques dont le but est de générer un pic de thrombine responsable de la transformation du fibrinogène en fibrine.

Les facteurs de la coagulation, procoagulants ou anticoagulants, sont majoritairement synthétisés par le foie (Roberts and Cederbaum, 1972). Ces facteurs sont synthétisés sous forme inactive ou de zymogène de protéase à sérine, de substrat tel que le fibrinogène ou de cofacteurs comme les facteurs V et VIII. Ces facteurs s'activent grâce à une cascade enzymatique pour aboutir à la transformation de la prothrombine en thrombine. Cette dernière converti le fibrinogène en fibrine, formant un réseau qui sera ensuite stabilisé par le facteur XIII.

1.3.1 Les facteurs vitamine K dépendants

Les facteurs procoagulants II, VII, IX et X, et les facteurs anticoagulants que sont la protéine C et la protéine S sont des facteurs vitamine K dépendants. Ces protéines contiennent des résidus d'acide carboxyglutamique dans le domaine Gla N-terminal. En présence de calcium, les facteurs subissent une modification conformationnelle exposant un site de liaison aux phospholipides. La vitamine K intervient comme cofacteur enzymatique dans l'étape de carboxylation qui permet aux facteurs de la coagulation d'adhérer aux phospholipides anioniques des

surfaces cellulaires (Furie et al., 1999). Un déficit en vitamine K engendre la synthèse par le foie de facteurs non fonctionnels PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence).

1.3.2 La cascade de la coagulation

La coagulation plasmatique est schématiquement scindée en plusieurs voies, extrinsèque et intrinsèque qui convergent au niveau du facteur X (Figure 6).

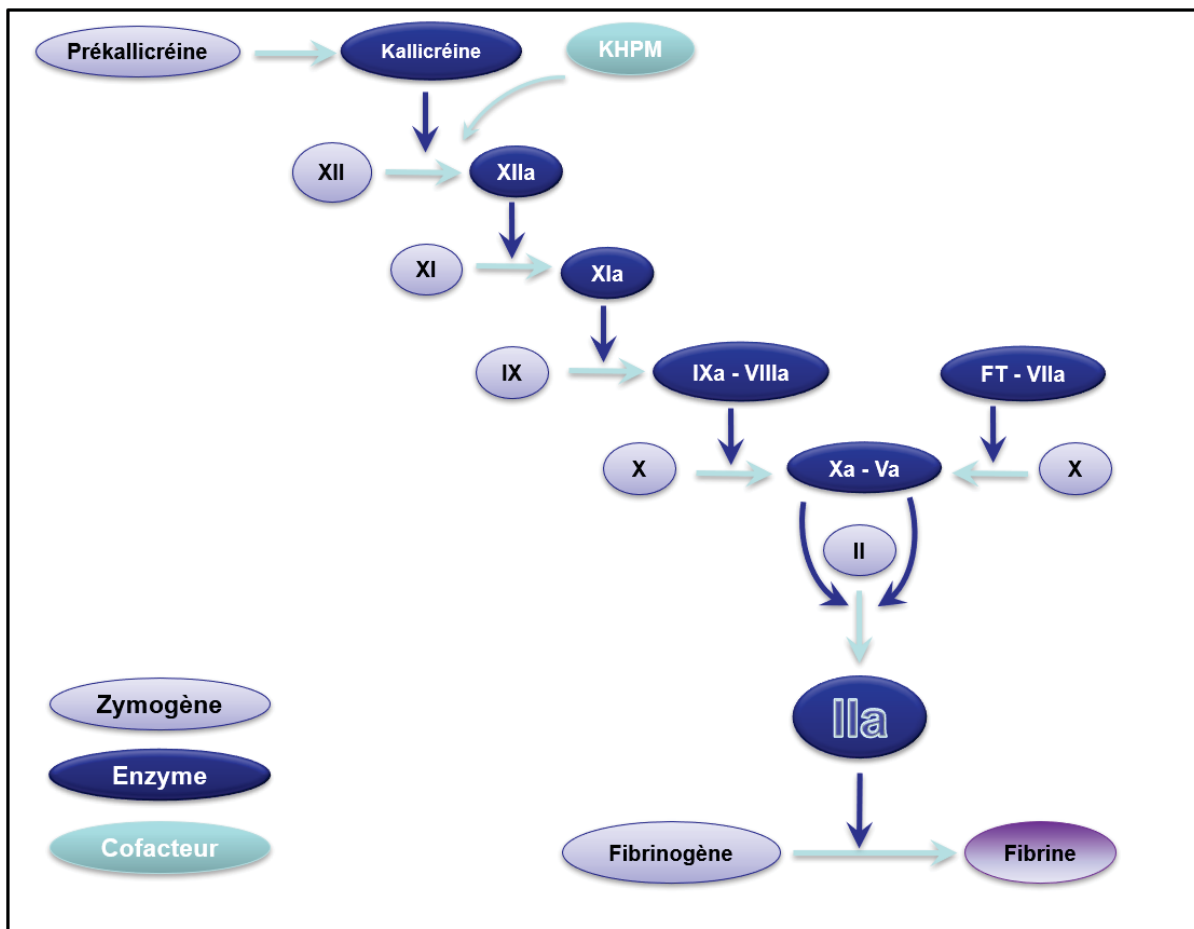


Figure 6 : Cascade de la coagulation plasmatique

La voie extrinsèque s'articule autour du complexe facteur tissulaire / facteur VII activé. Le facteur tissulaire est une protéine transmembranaire exprimée de manière constitutive par certaines cellules de la paroi vasculaire et les cellules musculaires lisses. On le retrouve à forte concentration dans les tissus tels que le poumon, le cerveau ou le placenta. Dans des conditions pathologiques telles qu'une brèche vasculaire, le facteur tissulaire va être exprimé par différents types de cellules comme les plaquettes, les cellules endothéliales ou les leucocytes ou il

va être exposé à la circulation et au facteur VII. Le facteur VII est une protéase à sérine qui circule à faible concentration dans le plasma (10 nM). La formation du complexe engendre rapidement une modification conformationnelle et l'activation en facteur VII activé par différents mécanismes incluant une protéolyse partielle (Mackman et al., 2007; Rand et al., 2006). Les substrats naturels du complexe comprennent le facteur VII, le facteur X et le facteur IX. Le facteur tissulaire interagit avec le domaine GLA des facteurs IX et X, phénomène modulé par le domaine GLA du facteur VII. L'activation de ces facteurs est réalisée en présence de phospholipides et de calcium (Gajsiewicz and Morrissey, 2015; Kirchhofer et al., 2000).

La voie intrinsèque fonctionne par une activation en cascade des facteurs XII, XI, IX et VIII, ces 2 derniers formant le complexe tenase capable d'activer le facteur X. Le facteur XII est une protéase à sérine principalement produite par le foie sous forme de zymogène à la concentration de 40 µg/mL (Didiasova et al., 2018). Le facteur XII s'autoactive en facteur XII activé suite à un contact avec des molécules ou surfaces chargées négativement telles que la silice, l'ARN, les polyphosphates ou la membrane plasmique des plaquettes (Grover and Mackman, 2019). Le facteur XII activé transforme la prékallicréine en kallicréine ce qui crée un rétrocontrôle positif de l'activation du facteur XII amplifié par le kininogène de haut poids moléculaire. Un déficit en ces molécules n'engendre pas de symptomatologie hémorragique. Le facteur XII est également capable d'activer le facteur XI en facteur XI activé (Björkqvist et al., 2014; Schmaier, 2016; Weidmann et al., 2017). Le facteur XI est une protéase à sérine possédant des homologues de structure avec la prékallicréine qui circule sous forme complexée avec le kininogène de haut poids moléculaire (Thompson et al., 1977). L'activation du facteur XI peut être réalisée par différentes molécules, incluant donc le facteur XII mais aussi la thrombine ou le facteur XI activé lui-même par auto-activation (Emsley et al., 2010; Matafonov et al., 2011). A l'opposé le facteur XI apparaît comme étant le facteur de la phase contact nécessaire à une hémostase normale. En effet, un déficit est particulièrement associé à des hémorragies post-opératoires ou suite à des traumatismes siégeant dans les territoires à forte activité fibrinolytique (Seligsohn, 2009). Néanmoins, le risque hémorragique des patients présentant un déficit en facteur XI est souvent compliqué à prédire, la symptomatologie étant peu corrélée aux taux circulants de facteur XI (Puy et al., 2016; Wheeler and

Gailani, 2016). Le rôle principal du facteur XI activé est la conversion du facteur IX en facteur IX activé par clivage protéolytique avec relargage d'un peptide d'activation via un processus indépendant des phospholipides (Gailani et al., 2014). Le facteur IX ou facteur anti-hémophilique B est une protéine synthétisée par le foie, contenant un domaine GLA et il constitue la partie protéasique du complexe tenase qu'il forme avec le facteur VIII une fois activé. Le clivage du peptide d'activation est réalisé soit par le complexe facteur tissulaire / facteur VII activé soit par le facteur XI activé. Le facteur IX activé comprend une chaîne légère et une chaîne lourde qui supporte l'activité protéasique (Schmidt and Bajaj, 2003). Le facteur VIII ou facteur anti-hémophilique A est lui aussi principalement synthétisé par le foie mais également par les cellules endothéliales, le rein ou le tissu lymphatique (Pan et al., 2016). Il est présent dans la circulation associé dans une liaison non covalente avec le facteur de Willebrand qui le protège d'une protéolyse précoce. Il circule dans le plasma sous forme d'un hétérodimère de 300 kDa, la chaîne lourde contenant les domaines A1, A2 et B, la chaîne légère les domaines A3, C1 et C2. L'interaction avec le facteur de Willebrand est médiée par les domaines A3 et C2 (Fang et al., 2007). Le facteur VIII est activé par la thrombine par protéolyse limitée engendrant la perte des domaines a3 et B à l'origine de sa séparation du facteur de Willebrand. Le facteur VIII va se concentrer à la surface phospholipidique où il va interagir avec le facteur IX activé et amplifier l'activation du facteur X en facteur X activé (Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016).

Les voies extrinsèque et intrinsèque convergent finalement à l'étape d'activation du facteur X. Le facteur X est une protéase à sérine synthétisée par le foie et vitamine K dépendante, possédant également un domaine GLA. Sous sa forme activée il va former le complexe prothrombinase par sa liaison au facteur V activé à la surface phospholipidique (Ahmad et al., 2003). Il est synthétisé par le foie et 80% est présent dans la circulation sanguine pour une concentration de 20 nM. Il est également retrouvé à hauteur de 20% dans les granules plaquettaires alpha. Le facteur V a une structure et une fonction analogue au facteur VIII au sein de son propre complexe avec notamment des domaines A présentant une homologie avec la céruléoplasmine suggérant un rôle dans la liaison des métaux, un domaine B et des domaines C assurant la liaison aux phospholipides (Tabibian et al., 2019). Le facteur V est activé par la thrombine et secondairement par le facteur X activé. La formation du complexe calcium dépendant avec le facteur X activé sur les

membranes phospholipidiques permet l'accélération de la conversion de la prothrombine en thrombine (Mann and Kalafatis, 2003; Schreuder et al., 2019). La prothrombine est une glycoprotéine vitamine K dépendante synthétisée par le foie et sécrétée dans le sang à une concentration élevée de 1,4 $\mu\text{mol/L}$. Ce zymogène va devoir subir 2 clivages séquentiels. En présence de facteur V activé le facteur X activé clive la prothrombine après l'Arginine320 pour former la meizothrombine. Celle-ci est ensuite clivée en Arginine271 donnant la thrombine d'une part et les fragments 1+2 d'autre part, ces derniers possédant notamment le domaine GLA (Davie and Kulman, 2006; Krishnaswamy, 2013). La thrombine est l'enzyme clé de la coagulation, elle va être responsable de la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui va former un réseau et consolider le clou plaquettaire.

1.3.3 Les inhibiteurs physiologiques de la coagulation

Ces facteurs procoagulants agissent au sein d'un processus finement régulé, notamment par l'action d'inhibiteurs physiologiques de la coagulation, tels que l'antithrombine, le système protéine C / protéine S ou le TFPI (Figure 8).

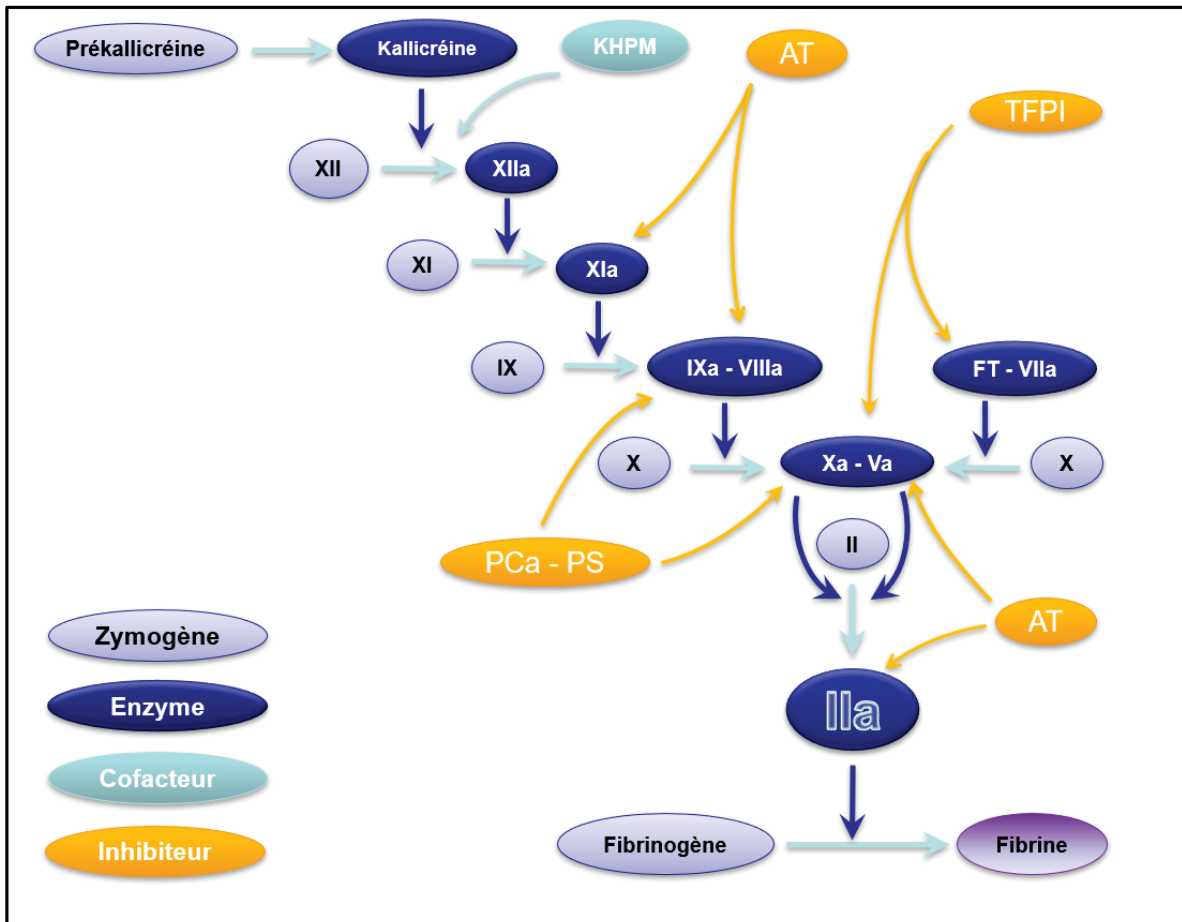


Figure 8 : Cibles des principaux inhibiteurs physiologiques de la coagulation plasmatique

L'antithrombine est une serpine (serin protease inhibitor) synthétisée par le foie qui circule à une concentration d'environ 2,6 $\mu\text{mol/L}$, soit près du double de la concentration de la thrombine (Conard et al., 1983). Il existe 2 isoformes circulantes d'antithrombine, alpha et beta avec respectivement 4 et 3 chaînes N-glycane, cette dernière ayant une affinité augmentée pour l'héparine. L'antithrombine est distribuée dans les compartiments extravasculaire, vasculaire et à la surface vasculaire. Le mécanisme d'action de l'antithrombine est analogue à celui des serpins. Elle agit comme substrat suicide en formant un complexe équimolaire avec les protéases à sérine cibles (Pike et al., 2005). Elles vont s'assembler dans un premier temps en un complexe enzyme substrat non covalent. Puis par formation d'une liaison ester le complexe acyl-enzyme induit un changement conformationnel de l'antithrombine et piège la protéase à sérine (Olson et al., 2010). L'antithrombine va ainsi inhiber l'action procoagulante de la plupart des protéases à sérine, notamment la thrombine, le facteur IX activé, le

facteur X activé et le facteur XI activé (RAU et al., 2007). A côté de son site actif, l'antithrombine dont l'action est naturellement lente, possède un site de liaison à l'héparine et aux héparanes sulfates, HBS (heparin binding site) dont l'interaction a pour effet une activation allostérique qui potentialise son action inhibitrice. Cette activation allostérique est primordiale pour l'inhibition des facteur IX activé et facteur X activé via le pentasaccharide. L'inhibition de la thrombine quant à elle est principalement liée à la formation d'un complexe permis par la présence de longue chaine d'héparine (Li et al., 2004; Olson et al., 1992; Pike et al., 1997). *In vivo*, l'antithrombine peut se lier aux héparanes sulfate ce qui permet de maintenir son activité anticoagulante au niveau de l'endothélium, participant à ses propriétés antithrombotiques (Quinsey et al., 2004). L'antithrombine peut également fixer l'héparine relarguée par l'endothélium. Son action au niveau du caillot demeure néanmoins limitée, notamment dans son inactivation de la thrombine ou du facteur X activé. Elle joue le rôle de sentinelle, empêchant le processus thrombogène de se propager de manière incontrôlée (Pike et al., 2005).

Le système de la protéine C comprend son cofacteur la protéine S, l'EPCR (endothelial Protein C Receptor) son récepteur membranaire, la thrombomoduline le récepteur à l'activateur de la protéine C, la thrombine.

La protéine C est une protéase à sérine vitamine K dépendante synthétisée sous forme de zymogène par le foie. Elle circule à la concentration de 70 nmol/L alors que sa forme activée par l'action protéolytique de la thrombine, la protéine C activée est présente à la concentration de 40 nmol/L. La protéine C comprend un domaine GLA qui permet notamment la liaison aux phospholipides anioniques ainsi que la fixation à son récepteur l'EPCR, 2 domaines EGF (epidermal growth factor) impliqués dans la liaison à son cofacteur la protéine S, un peptide d'activation et le site actif (Griffin et al., 2007; Preston et al., 2005). Le clivage par la thrombine en Arginine169 libère le peptide d'activation et forme la protéine C activée. Cette activation initialement très lente est accélérée par la fixation de la thrombine sur la thrombomoduline. Le thrombomoduline est une molécule transmembranaire qui ne possède pas d'activité enzymatique en elle-même. La thrombomoduline présente à la surface des cellules endothéliales forme un complexe avec la thrombine au sein duquel cette dernière perd ses propriétés procoagulantes de liaison au fibrinogène, et d'interaction avec le récepteur PAR-1. A l'inverse, elle permet à la thrombine de catalyser la formation de protéine C activée d'un facteur

x1000 comparée à la thrombine seule (Li et al., 2012; Weiler and Isermann, 2003). L'EPCR, le récepteur à la protéine C, permet lui aussi d'accélérer sa transformation en protéine C activée. L'EPCR est une glycoprotéine transmembranaire qui présente une homologie de structure avec le complexe majeur d'histocompatibilité. Hormis la protéine C, il peut également se lier à d'autres ligands tels que le facteur X. La distribution de l'EPCR est différente de celle de la thrombomoduline. L'EPCR est particulièrement présent sur l'endothélium des vaisseaux de gros calibre alors que la thrombomoduline est retrouvée dans la microcirculation (Mohan Rao et al., 2014).

La protéine S est un facteur vitamine K dépendant produit par le foie. Deux tiers de la protéine S circulante est inactive, liée à la C4BP (C4b-binding protein) tandis que les 150 mmol/L restant circulent librement (Dahlbäck, 2018).

La protéine C activée va dégrader les facteurs V activé et VIII activé, cofacteurs au sein des complexes prothrombinase et tenase, respectivement. Cela impacte la phase d'amplification de la génération de thrombine. Le facteur V activé est clivé sur 3 sites, Arginine306, Arginine506 et Arginine679. Le clivage en Arginine306 nécessite la présence de la protéine S. Le clivage en Arginine506 est moins dépendant du cofacteur mais il est inhibé par la formation du complexe prothrombinase avec le facteur X activé (Griffin et al., 2007; Mann and Kalafatis, 2003). En présence de protéine S, la protéine C activée est également en mesure de cliver le zymogène facteur V en Arginine506 relevant une propriété anticoagulante. Ce dernier est capable de se comporter en cofacteur de la protéine C activée dans l'inhibition du facteur VIII activé (Thorelli et al., 1999). La protéine C activée peut ainsi cliver le facteur VIII activé en Arginine336 et Arginine562 en présence de protéine S (Figure 9).

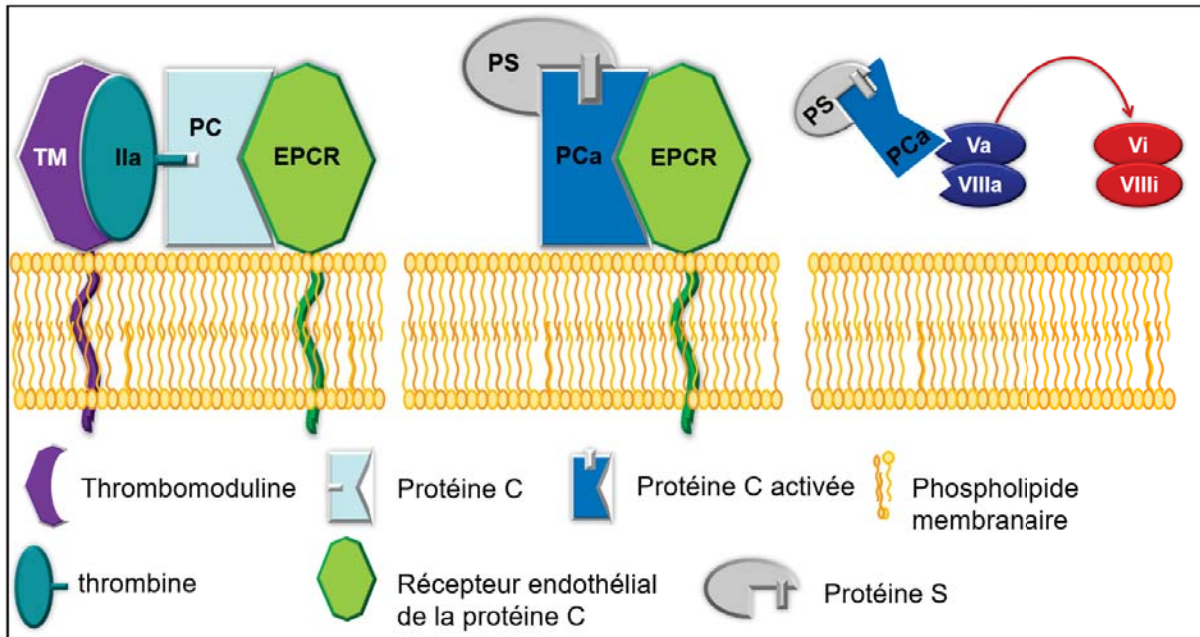


Figure 9 : Schéma du système protéine C / protéine S

1.3.4 Le modèle cellulaire de la coagulation *in vivo*

Au-delà du concept *in vitro* de coagulation plasmatique basé sur les différentes voies (extrinsèque et intrinsèque) de la coagulation, le phénomène *in vivo*, plus complexe, intègre une composante cellulaire et se décompose en plusieurs phases (Figure 10).

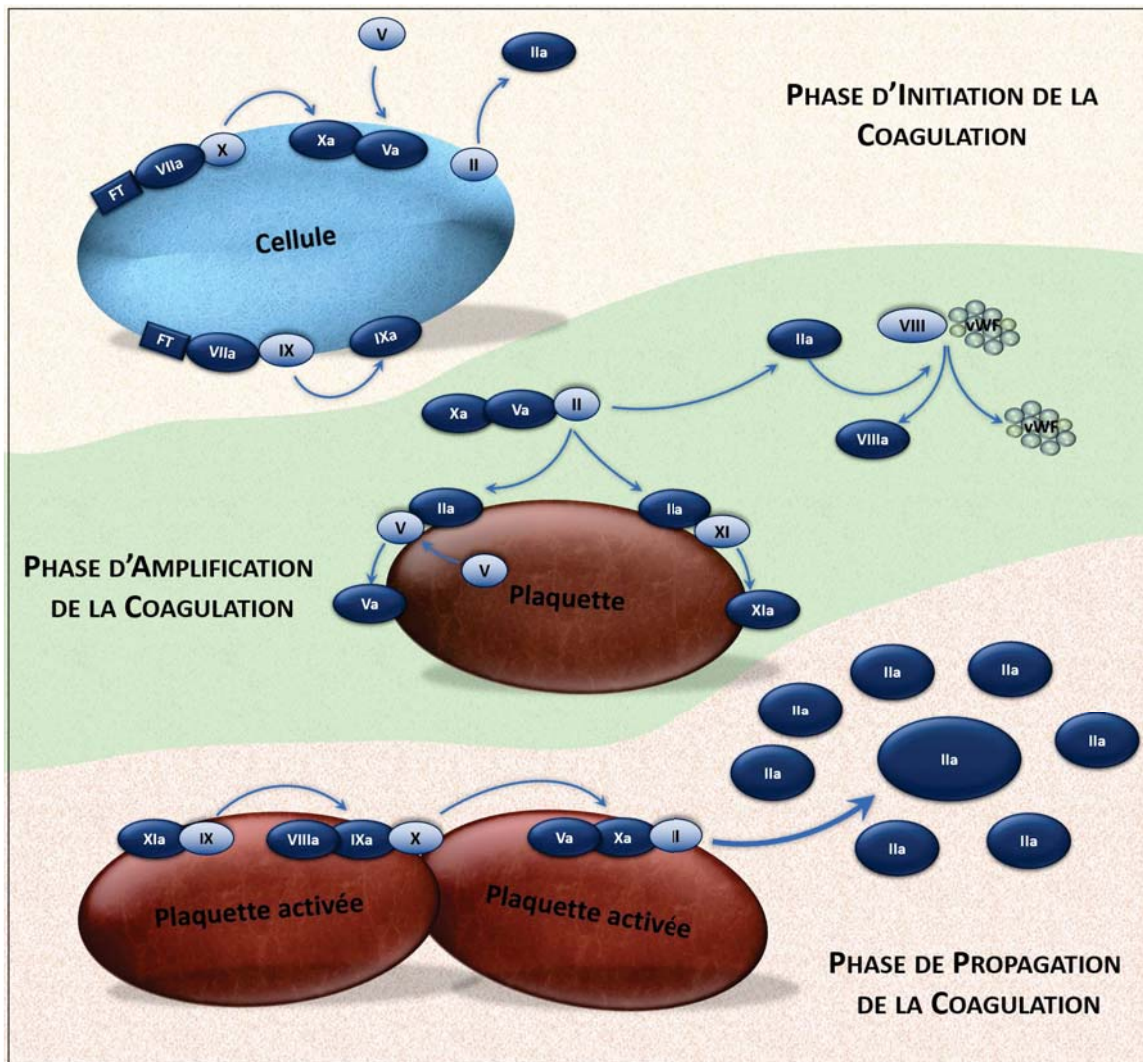


Figure 10 : Schéma de la coagulation plasmatique intégrant la composante cellulaire

Le principal initiateur physiologique de la coagulation est le facteur tissulaire exprimé par différents types cellulaires et qui au niveau d'une brèche vasculaire va interagir avec le facteur VII. Le complexe facteur tissulaire / facteur VII activé va lui-même activer le facteur X qui va former avec le facteur V activé le complexe prothrombinase. Ce dernier va ainsi générer de petites quantités de thrombine. Cette thrombine, encore insuffisante pour former le réseau de fibrine, va néanmoins être au centre de l'étape d'amplification. Sous l'action de la thrombine, les plaquettes localisées à proximité des sites d'exposition du facteur tissulaire vont adhérer fermement au sous endothélium et vont s'activer complètement. Si elles n'expriment pas le facteur tissulaire, les plaquettes jouent néanmoins un rôle

central dans le processus de coagulation *in vivo*. Suite à leur activation, elles vont fournir une surface d'assemblage pour les facteurs de coagulation, notamment en exprimant la phosphatidylsérine. Elles vont également libérer le facteur V à partir de leurs granules alpha. La thrombine va également amplifier sa propre formation en activant des facteurs de la coagulation tels que le facteur V, le facteur VIII et le facteur XI. La phase de propagation intervient quand les complexes tenase et prothrombinase assemblés à la surface des plaquettes vont générer une quantité explosive de thrombine responsable de la formation du caillot de fibrine (Hoffman, 2003; Hoffman and Monroe, 2001; Mann et al., 2003) (Figure 11).

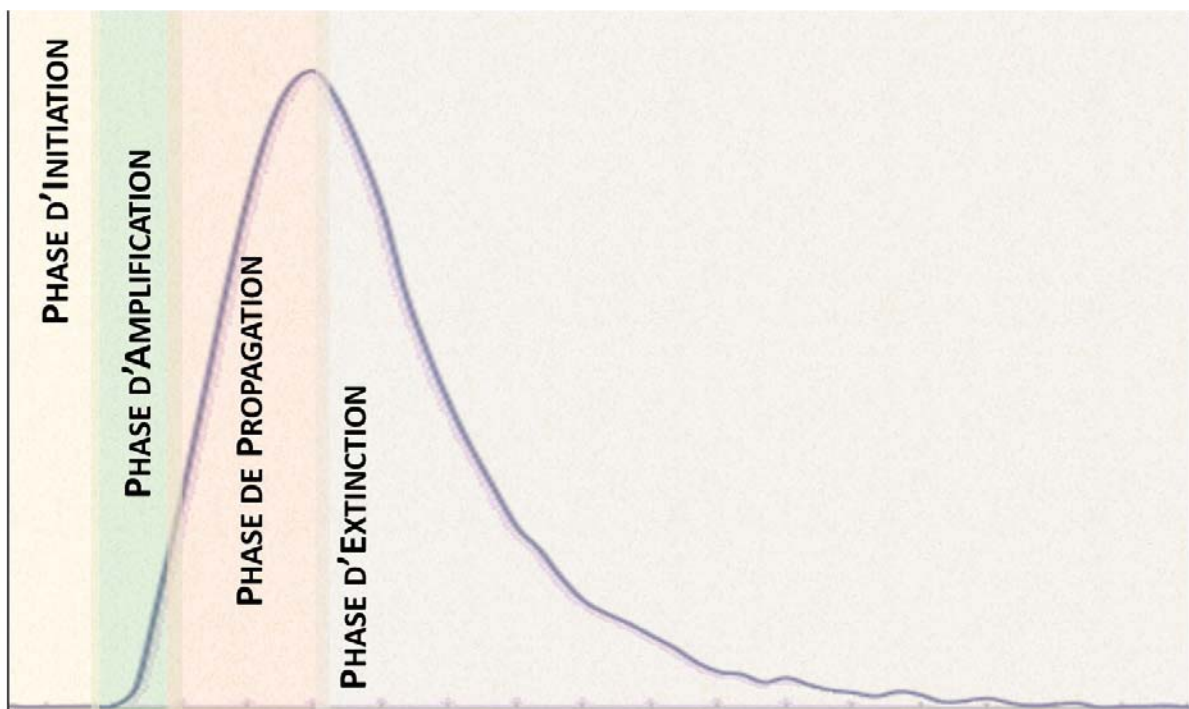


Figure 11 : Différentes phases de la coagulation plasmatique en regard de la génération de thrombine

1.3.5 La fibrinoformation

Le fibrinogène est une glycoprotéine soluble synthétisée par le foie à la concentration plasmatique de 2 à 4 g/L. On le retrouve également dans les granules alpha plaquettaires via un processus d'internalisation à partir de la circulation (Weisel and Litvinov, 2017). Le fibrinogène intervient en plus de l'hémostase dans la cicatrisation, l'inflammation ou l'angiogenèse. Il est constitué de trois paires de chaînes polypeptidique A α , B β et γ qui forment une structure de

46 nm de long, de masse moléculaire de 340 kDaltons, avec des régions nodulaires aux extrémités reliées par des brins en forme de bâtonnets. Le fibrinogène s'organise en 2 régions D à chaque extrémité et une région centrale E qui contient les fibrinopeptides A et B (acides aminés N-terminaux des chaînes α et β). Le clivage des fibrinopeptides par la thrombine dont le clivage permet la formation de monomères de fibrine qui vont s'associer par des liaisons non covalentes en protofibrilles de fibrine. Pour cela, les « boutons » A, correspondants aux parties N-terminales des chaînes α nouvellement formées suite au clivage dans la région E, interagissent avec les « poches » a de la chaîne γ située dans la région D de monomères adjacents. Cela permet la formation spontanée de protofibrilles bicaténaires semi-décalées. De manière analogue les « boutons » B vont interagir avec les « poches » b de la chaîne β et les régions D vont également s'apparier. (Weisel, 2005; Wolberg, 2007). Lorsque les protofibrilles sont suffisamment longues elles vont s'agréger latéralement pour former des fibres de fibrine. La stabilisation de ce réseau fait intervenir le facteur XIII activé par la thrombine en présence de fibrine et de calcium. Il réalise des liaisons covalentes entre les chaînes α et γ , ce qui stabilise le caillot de fibrine et lui confère des propriétés de résistance mécanique et de protection vis-à-vis d'une dissolution prématurée (Bagoly et al., 2012; Mihalko and Brown, 2020) (Figure 12).

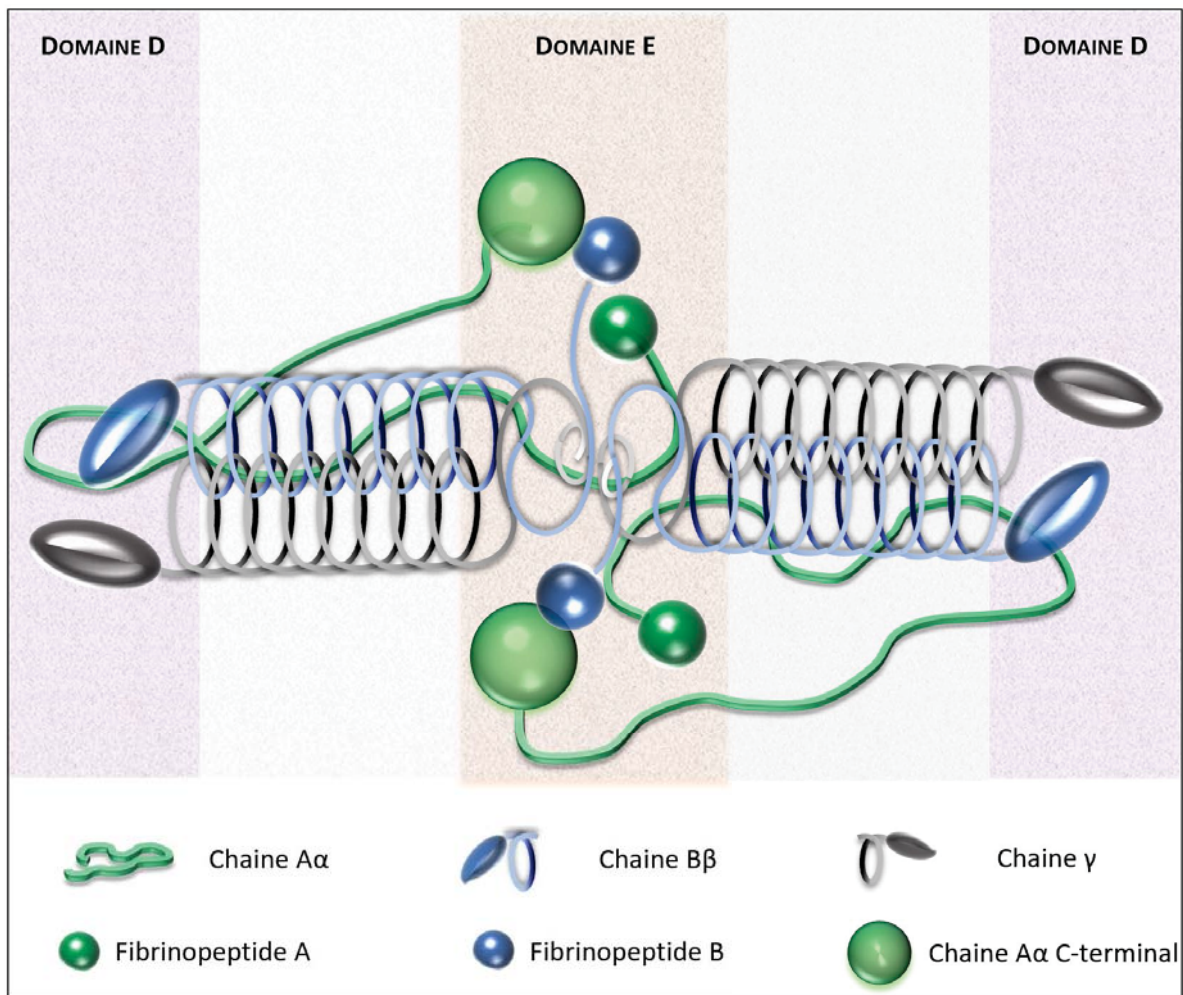


Figure 12 : Structure du fibrinogène

1.4 Exploration de la coagulation plasmatique

1.4.1 Les tests classiques d'exploration de la coagulation plasmatique

Devant un syndrome hémorragique ou une suspicion de déficit en facteur procoagulant des tests d'exploration généraux sont généralement réalisés tels que le temps de Quick (TQ) ou le temps de céphaline avec activateur (TCA). Le TQ est prolongé en cas de déficit en facteur VII, le TCA en cas de déficit en facteur VIII, IX, XI ou XII et les 2 tests sont impactés par un déficit en facteur de la voie commune, X, V, prothrombine et fibrinogène. Le TQ qui explore la voie extrinsèque correspond à la mesure d'un temps de coagulation à 37°C d'un plasma déplaqueté en présence d'un mélange de facteur tissulaire et de phospholipides (thromboplastine) et calcium. Le complexe facteur tissulaire / facteur VII activé

active le facteur X qui avec le facteur V activé forme une faible quantité de thrombine capable de transformer le fibrinogène soluble en gel de fibrine.

Le TCA qui explore la voie intrinsèque correspond à un temps de coagulation à 37°C d'un plasma déplaqueté en présence d'une surface chargée négativement comme la silice ou le kaolin ainsi que de phospholipides et de calcium. L'activateur chargé négativement active le facteur XII en présence de prékallitréine et de kininogène de haut poids moléculaire. Le facteur XII activé active le facteur XI qui active lui-même le facteur IX. Le facteur IX activé forme avec le facteur VIII activé le complexe tenase capable d'activer le facteur X, ce qui aboutira à la formation de thrombine puis de fibrine.

Le TQ et le TCA, conçus initialement pour explorer les mécanismes de la coagulation et évaluer la purification des facteurs de coagulation du plasma, demeurent les tests les plus pratiques pour donner une estimation globale de l'activité de la plupart des facteurs procoagulants. Ces tests souffrent néanmoins de limitations majeures dans l'appréciation fine de la coagulation d'un sujet. Tout d'abord, des temps normaux n'excluent pas un déficit modéré (Boender et al., 2016). Ils sont complètement aveugles à toutes modifications des taux de facteurs anticoagulants physiologiques comme l'antithrombine ou la protéine C, ce qui rend leur utilisation dans le cadre de la thrombophilie peu utile. Par ailleurs, leur exploration de la thrombine formée est parcellaire puisque la gélification du plasma survient dès qu'approximativement 5% de la thrombine totale est formée, laissant les 95% restant non détectés et donc non pris en compte. S'ils restent prépondérants dans l'exploration des déficits en facteur procoagulant tel que l'hémophilie, ces tests sont inaptes à apprécier correctement l'équilibre existant *in vivo* entre facteurs procoagulants et inhibiteurs de la coagulation. C'est particulièrement remarquable dans les coagulopathies acquises telle que la cirrhose, marquée par une diminution concomitante de la plupart des facteurs, où le TQ est diminué alors que les patients présentent une hypercoagulabilité (Tripodi, 2008; Tripodi et al., 2009) (Figure 13).

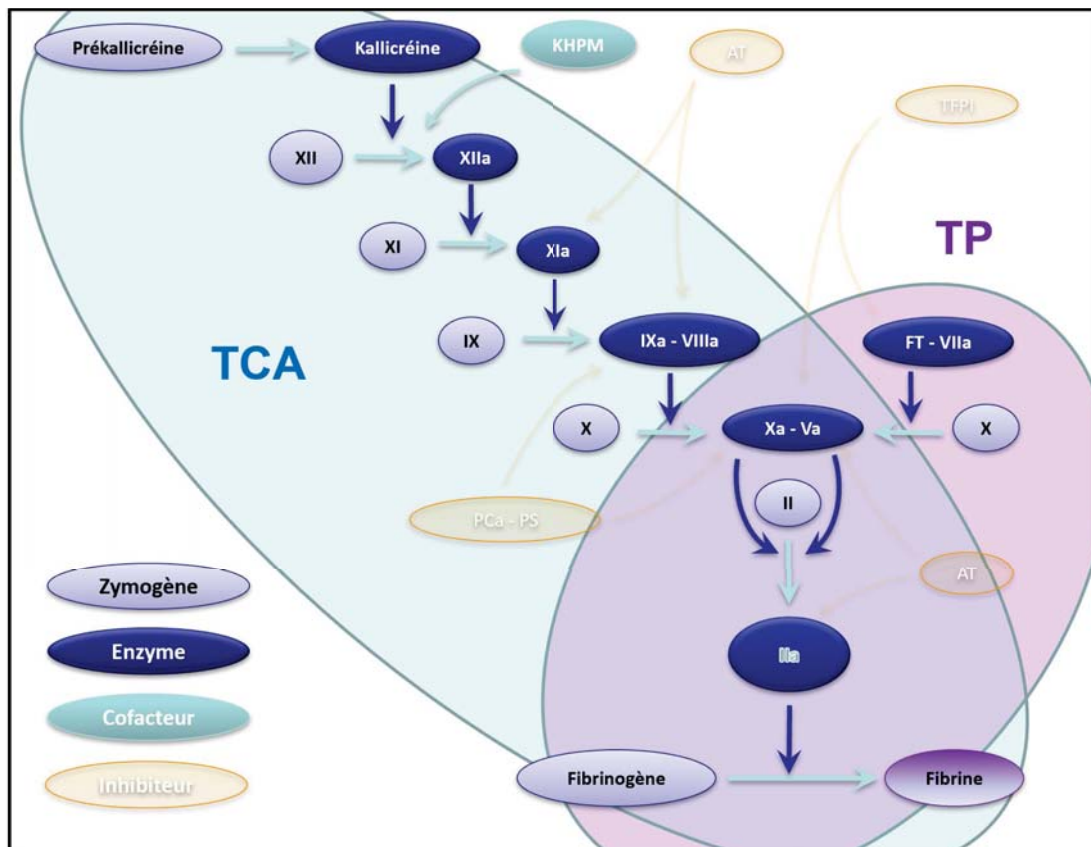


Figure 13 : Exploration de la coagulation plasmatique par les tests classiques

Devant un temps de coagulation allongé, l'approche diagnostique consiste en l'exploration spécifique des facteurs associés. Dans un premier temps un dosage fonctionnel est réalisé, seul capable de mettre en évidence un déficit quantitatif comme qualitatif. Il pourra le cas échéant être complété par un dosage immunologique. Les taux de facteur peuvent être déterminés par un test chromométrique ou un test chromogénique. Le fibrinogène est classiquement mesuré par la méthode de Clauss. Le retentissement clinique d'un taux de facteur diminué est variable. Le phénotype hémorragique est fortement corrélé au taux de facteurs X, XIII et fibrinogène, moyennement pour les facteur V et VII et le taux de facteur XI n'est pas prédictif du risque hémorragique (Peyvandi et al., 2012b, 2012a).

Hormis les D-dimères qui entre dans la démarche diagnostique de la maladie thromboembolique veineuse (Lim et al., 2018) et dans les scores de management de l'anticoagulation (Ensor et al., 2016) l'utilisation des tests de coagulation fait

débat. La recherche de facteurs biologiques de risque de thrombose ne doit pas être réalisée systématiquement mais s'inscrit dans une démarche personnalisée vis-à-vis du patient, et ce par un médecin spécialiste. L'intérêt clinique dans l'évaluation du risque de premier événement ou de récurrence et dans le choix et la durée des anticoagulants demeure controversé (Garcia et al., 2013; Konstantinides et al., 2019; Machin, 2003; Martinelli, 2003; Moran and Bauer, 2020). La recherche s'articule principalement autour des thrombophilies héréditaires incluant les déficits dans les principaux inhibiteurs physiologiques de la coagulation, l'antithrombine, la protéine C et la protéine S et les mutations procoagulantes du facteur V et du facteur II (Baglin et al., 2010; Pruthi, 2017).

1.4.2 Les tests globaux d'exploration de la coagulation plasmatique

Ces dernières années une approche phénotypique de la coagulation plasmatique, la thrombinographie ou test de génération de thrombine a présenté un regain d'intérêt dans la mesure où elle intègre la plupart des facteurs procoagulants et anticoagulants et permet une mesure de la totalité de la thrombine. Elle permet de mimer la coagulation plasmatique *in vivo* en reproduisant les différentes phases : l'initiation, l'amplification, la propagation et enfin l'inhibition.

A l'origine, la génération de thrombine était mesurée par sous échantillonnage à différents temps de la réaction. De manière analogue au processus *in vivo*, la coagulation était déclenchée par l'ajout au plasma de facteur tissulaire, de phospholipides et de calcium. Le plasma était prélevé périodiquement afin de déterminer l'activité thrombinique grâce à différents substrats et dans des conditions analytiques variables (Hemker et al., 1993; Lau et al., 2007). Par la suite, la méthode a évolué avec une automatisation de la détection de la densité optique obtenue grâce aux substrats chromogènes de la thrombine ajoutés directement au plasma et qui ont remplacé le fibrinogène. Un plasma défibriné était indispensable car l'absorption de la lumière pouvait être influencée par la gélification du plasma. Cela impliquait aussi l'impossibilité de réaliser les mesures en présence de plaquettes, ne permettant ainsi de ne travailler que sur du plasma pauvre en plaquettes (Baglin, 2005; H. Coenraad Hemker et al., 2003).

Aujourd'hui, les substrats fluorogènes se sont substitués aux substrats chromogènes. Cette technique présente l'avantage d'être peu influencée par la turbidité, la constitution du caillot et la présence de plaquettes. Il est donc possible

d'effectuer les mesures sans défibriner le plasma et d'étudier le rôle des plaquettes dans la coagulation en utilisant du plasma riche en plaquettes (Hemker et al., 2003; Hemker et al., 2002). La méthode CAT (Calibrated Automated Thrombogram) décrite par Hemker et coll. (Hemker et al., 2002) présente les avantages d'une automatisation partielle grâce à un fluorimètre équipé d'un distributeur, de l'utilisation d'un substrat fluorogène et traitement informatique des données. Sur plasma pauvre en plaquettes, la coagulation est initiée au choix par une concentration faible (de l'ordre de 1 pmol/L), intermédiaire (de l'ordre de 5 pmol/L) ou forte (de l'ordre de 20 pmol/L) de facteur tissulaire en présence de phospholipides procoagulants. Les plaques 96 puits sont incubées 10 minutes à 37°C avant l'addition du substrat fluorogène et de calcium. Les données de fluorescence sont ensuite analysées par un logiciel dédié qui permet de déterminer la quantité de thrombine produite au cours du temps.

Plusieurs écueils, récurrents lors des expérimentations de génération de thrombine, sont pris en compte par cette technique :

- l'affinité du substrat : Le substrat qu'il soit chromogène ou fluorogène ne doit pas présenter une affinité trop élevée pour la thrombine. Dans le cas contraire, les antithrombines entreraient en compétition avec le substrat, entraînant une surestimation de l'activité thrombinique mesurée.

- Le rôle de l'alpha2-macroglobuline : La thrombine est inactivée de deux manières différentes. D'une part, elle est capturée par l'antithrombine qui bloque le site actif de la thrombine l'empêchant d'exercer son action protéolytique. D'autre part, elle se lie à l'alpha2-macroglobuline (α_2m) formant un complexe qui n'a plus de fonction physiologique de transformation du fibrinogène en fibrine, mais est toujours capable de convertir les petits substrats fluorogènes. Durant la réaction, la conversion des substrats va donc perdurer, alors que la thrombine est totalement inactive du point de vue hémostatique. Pour pallier cela, l'utilisation d'un calibrant et d'un programme d'analyse est indispensable pour déterminer la génération de thrombine véritablement produite en supprimant mathématiquement sur l'ensemble de la courbe l'activité de l' α_2m -thrombin.

- La déplétion en substrat : Durant la réaction, la concentration du substrat fluorogène diminue progressivement à mesure que la thrombine est produite. Cela entraîne une diminution de la vélocité de la thrombine vis-à-vis de celui-ci ayant

pour conséquence, en l'absence de correction, une sous-estimation croissante du signal.

- L'Inner filter effect ou effet filtre correspond à la non-linéarité de la relation entre la fluorescence mesurée et la quantité de fluorophore. En l'absence de correction les concentrations fortes sont sous-estimées.

- La couleur du plasma : La présence d'ictère ou d'hémolyse peut faire varier la couleur d'un plasma entraînant du même coup une absorption variable de lumière émise par les molécules fluorescentes ou fournie par le fluorimètre.

Pour pallier ces sources d'erreur, Hemker a estimé qu'il était nécessaire d'utiliser une calibration propre à chaque plasma étudié. Le calibrant (Thrombin Calibrator) est constitué de thrombine en quantité connue et liée à l' $\alpha_2\text{m}$. Celui-ci est ajouté au plasma d'intérêt dans un second puit sans que les conditions analytiques en soient modifiées par ailleurs. Le complexe agit sur le substrat fluorigène sans faire coaguler le plasma et permet d'obtenir une courbe linéaire. Or, du fait de la déplétion en substrat ainsi que de l'effet filtre, le suivi de la fluorescence émise montre une courbe qui s'infléchit. Par conséquent, pour chaque niveau de fluorescence, un facteur de correction est déduit et appliqué à la courbe de fluorescence du spécimen étudié. Dans le même temps, la fluorescence peut être convertie en concentration molaire de thrombine. De plus, l'utilisation du plasma à la fois pour la mesure et pour la calibration permet de s'affranchir des particularités du plasma et des paramètres matériels (Hemker et al., 2003).

La thrombinographie permet donc d'évaluer quantitativement la cinétique de génération de thrombine par mesure de la fluorescence appréciant ainsi le potentiel hémostatique d'un patient. *In vitro*, la thrombinographie s'articule autour de 3 étapes. Elle débute par une phase d'initiation durant laquelle le facteur tissulaire interagit avec le facteur VII activé formant un complexe. Celui-ci active le facteur IX et le facteur X qui transforme de petites quantités de prothrombine en thrombine. On observe ensuite une phase d'amplification, conséquence de l'action de la thrombine. Puis survient une phase de propagation ou l'activité enzymatique du complexe prothrombinase va être à l'origine de la génération du pic de thrombine.

La thrombine joue un rôle central tout au long de ce phénomène. Elle accélère le processus de coagulation en amplifiant sa propre formation. Pour cela, elle active

notamment les facteur V, facteur VIII, facteur XI ainsi que les plaquettes (lorsque le test est réalisé sur plasma riche en plaquettes). Le facteur IX se complexe au facteur VIII pour former le complexe tenase, principal activateur du facteur X. Ce dernier fixe le facteur V pour former le complexe prothrombinase qui va être à l'origine de la formation de plus de 95% de la thrombine totale.

Enfin, on observe une phase d'extinction qui associe 2 phénomènes : disparition de l'activité du complexe prothrombinase et épuisement de la prothrombine. A cela s'ajoute l'action des facteurs anticoagulants qui devient prépondérante.

La courbe de génération de thrombine peut donc fournir de nombreux paramètres exploitables (Figure 14) :

- Aire sous la courbe ou *Potentiel Endogène de Trombine* renseignant sur la quantité totale de thrombine générée
- Hauteur du pic qui est la concentration maximale de thrombine. Elle résulte des étapes d'amplification et de propagation de la coagulation.
- Temps de latence qui est la durée pour voir apparaître les premières traces de thrombine. Il reflète la phase d'initiation de la coagulation.
- Temps d'obtention du pic

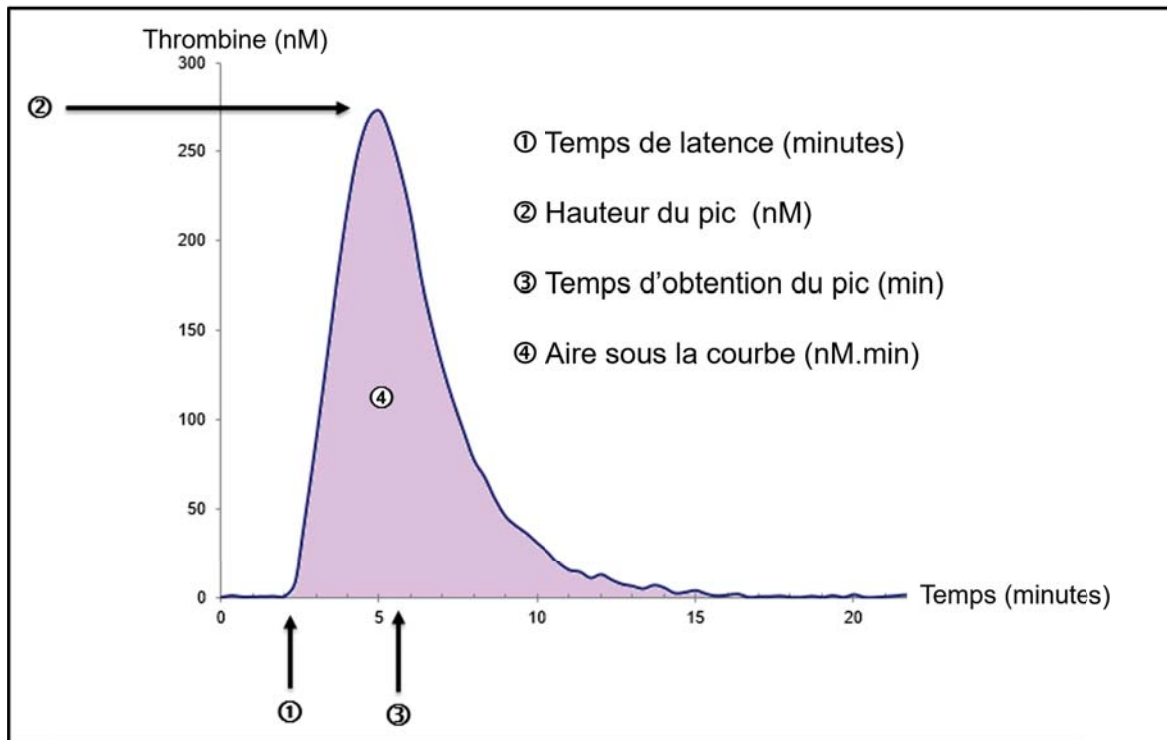


Figure 14 : Principaux paramètres du test de génération de thrombine

Le paramètre majeur est le potentiel endogène de thrombine (ETP). C'est celui qui évalue la coagulation de la façon la plus complète possible en intégrant l'effet des facteurs anticoagulants et procoagulants.

Le tracé définitif du thrombinogramme est le fruit de transformations successives des données réalisées par le logiciel Thrombinoscope™. Celui-ci fournit plusieurs courbes :

- Une courbe de calibration où la fluorescence n'est pas linéaire à cause des phénomènes « d'effet filtre » et de déplétion en substrat qui ralentissent la vitesse de sa conversion par la thrombine (Figure 15A).
- Une courbe de fluorescence brute obtenue à partir des puits d'analyse dans laquelle les phénomènes « d'effet filtre » et de déplétion en substrat sont corrigés (Figure 15B).
- La dérivée première de cette dernière (Figure 15C).
- La courbe finale de génération de thrombine où le signal est converti en concentration de thrombine et où l'activité amidolytique du complexe thrombine – alpha2-macroglobuline est soustraite (Figure 15D).

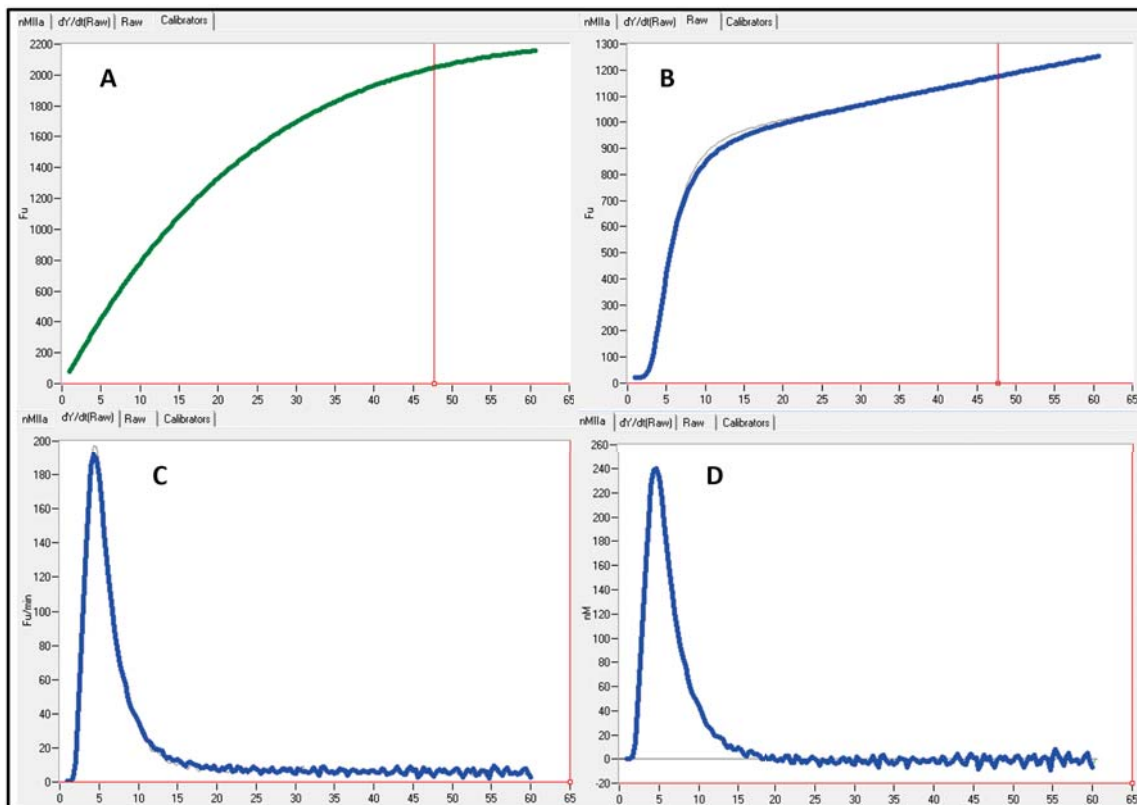


Figure 15 : Tracés du test de génération de thrombine

Contrairement aux tests classiques de la coagulation, la mesure de la génération de thrombine permet d'évaluer au mieux l'action des différents systèmes inhibiteurs. Néanmoins, l'exploration du système protéine C / protéine S nécessite la présence de thrombomoduline pour que la thrombine puisse activer de façon optimale la protéine C. Classiquement, la concentration en thrombomoduline utilisée est celle capable d'inhiber à 50% l'ETP moyen de sujets sains. Avec la méthode CAT, aucun réactif de génération de thrombine n'intégrant de la thrombomoduline, celle-ci doit être ajoutée manuellement au mélange facteur tissulaire phospholipides. En pratique, chaque lot de réactif nécessite donc la réalisation de manipulation de génération de thrombine sur sujets sains intégrant la réalisation d'une gamme de concentration croissante de thrombomoduline afin de déterminer la concentration moyenne inhibant 50% du potentiel endogène de thrombine. Une technique automatisée plus récente réalisée sur l'automate Genesis™ permet une meilleure standardisation avec notamment des réactifs prêts à l'emploi.

1.5 Les microparticules

1.5.1 La formation des microparticules

Les microparticules sont des vésicules anucléées de tailles variables, allant de 100 à 1000 nm. Elles sont à distinguer des exosomes, plus petits et n'intervenant pas dans la phase de coagulation ainsi que des corps apoptotiques, généralement de tailles supérieures et contenant du matériel nucléaire.

Les microparticules peuvent être libérées par l'ensemble des cellules. Les microparticules d'origine plaquettaire sont la principale fraction des microparticules circulantes (Brisson et al., 2017). D'autres types de cellules, telles que les monocytes, les hématies, les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses, produisent aussi des microparticules. Plus rarement, on peut retrouver dans la circulation des microparticules issues des fibroblastes ou des cellules tumorales (Voukalis et al., 2019)

Chez les sujets sains, la production de microparticules à partir de ces cellules s'inscrit dans différents processus physiologiques, tels que la différenciation cellulaire ou l'apoptose (Beaudoin and Grondin, 1991). Leur libération est augmentée dans diverses situations pathologiques telles que les cancers, le diabète, le sepsis ou les maladies cardiovasculaires en réponse à des stimuli divers comme l'inflammation, le stress oxydatif, ou l'hypoxie (Lovren and Verma, 2013; Pardo et al., 2018; Raeven et al., 2018).

Le bourgeonnement cellulaire à l'origine de la formation de microparticules est un phénomène associant un réarrangement des phospholipides membranaire à un remaniement du cytosquelette (Figure 16).

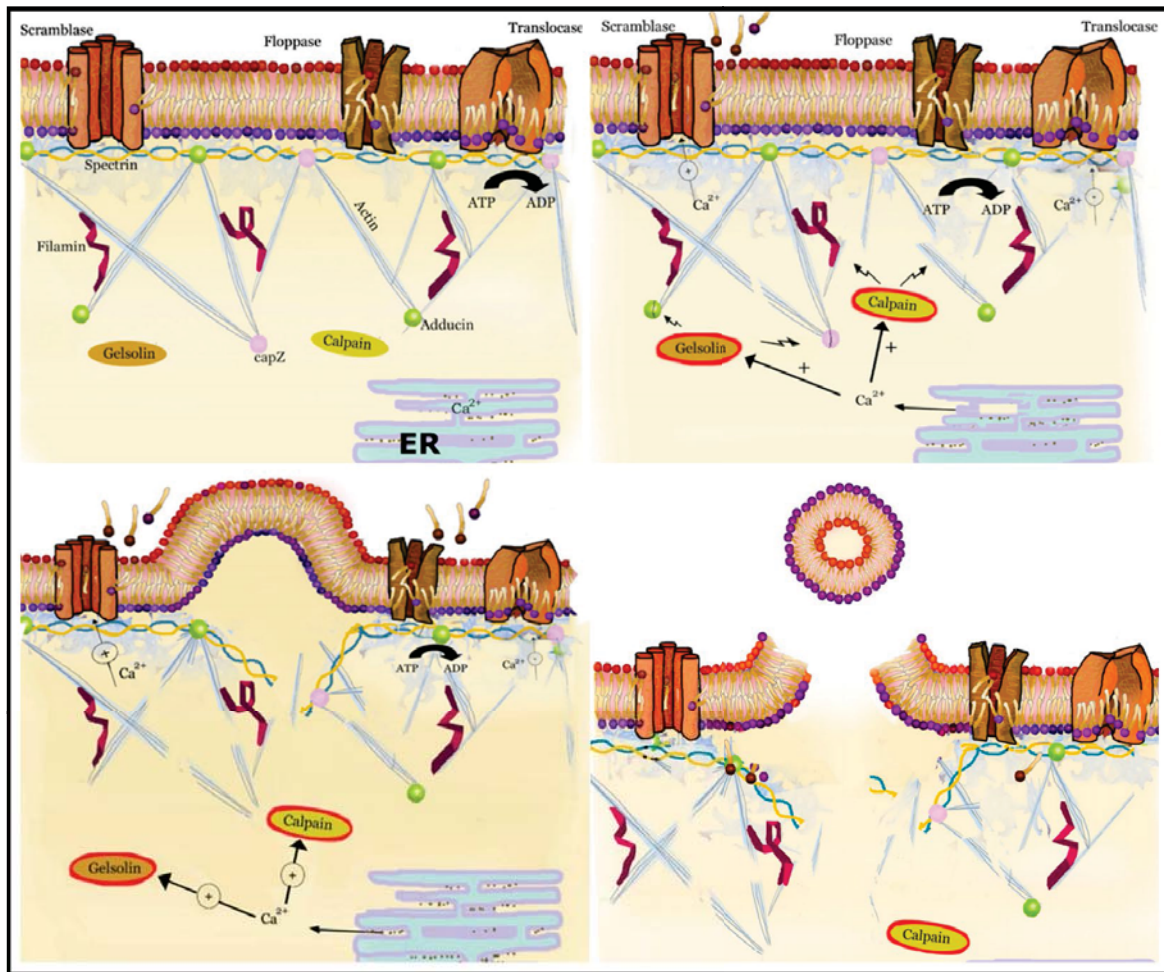


Figure 16 : Mécanisme de vésiculation des microparticules

D'après Piccin, A., Murphy, W. G., & Smith, O. P. (2007). *Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood Reviews, 21(3), 157-171.*

La membrane plasmique des cellules eucaryotes est formée d'une bicouche phospholipidique. Les cellules non activées présentent au niveau de leur membrane plasmique une asymétrie de la composition phospholipidique, les aminophospholipides, tels que la phosphatidylsérine ou la phosphatidyléthanolamine, prédominent au niveau du feuillet interne alors que les phospholipides cationiques riches en choline sont principalement retrouvés dans le feuillet externe. Cette composition particulière est sous la dépendance d'enzymes telles que les floppases, translocases et scramblases (Nagata et al., 2016; Suzuki and Nagata, 2014).

Suite à l'activation cellulaire ou à l'apoptose, la concentration de calcium intracellulaire augmente engendrant une relocalisation de la phosphatidylsérine dans le feuillet externe grâce à l'action des enzymes (Nagata et al., 2020). Des mécanismes annexes sont également responsables de l'externalisation de la phosphatidylsérine, tels que l'enrichissement de la membrane plasmique des monocytes en cholestérol, responsable de la formation de microparticules riches en facteur tissulaire (Liu et al., 2007). Cependant l'existence de microparticules ne se liant pas à l'annexine V suggère d'autres mécanismes n'impliquant pas la phosphatidylsérine. Ces phénomènes, associés à la dégradation du cytosquelette par des enzymes telles que la calpaïne ou les caspases entraînent la formation de microparticules (Morel et al., 2011; Yan et al., 2009).

1.5.2 Les propriétés des microparticules

Les propriétés des microparticules sont étroitement liées à leur composition, elle-même dépendante des cellules dont les microparticules sont issues ainsi que du stimulus initial. Les microparticules plaquettaires expriment la glycoprotéine IIb-IIIa (CD41), la glycoprotéine Ib (CD42b) et des marqueurs d'activation comme la sélectine P (CD62P) (Diamant et al., 2004; Melki et al., 2017). Il a par ailleurs été rapporté une différence de composition selon la taille des microparticules plaquettaires. En effet, le ratio protéines / lipides, la nature des protéines ou encore les propriétés fonctionnelles varient (Dean et al., 2009). Les microparticules endothéliales quant à elles, expriment des protéines impliquées dans les processus d'adhésion et de fusion ou encore des molécules de la coagulation telles que le facteur tissulaire, en réponse notamment à certains stimuli (Banfi et al., 2005; Dignat-George and Boulanger, 2011; Zwicker et al., 2011). Les microparticules d'origine leucocytaire expriment des molécules d'adhésion telles que PSGL-1, des molécules de l'inflammation comme l'interleukine-1beta, du facteur tissulaire et du récepteur 3 du complément (Ridger et al., 2017).

1.5.3 Le rôle des microparticules dans l'hémostase

De plus en plus de preuves existent en faveur de l'importance des rôles physiologiques et pathologiques des microparticules. Les microparticules sont capables d'interférer dans la communication cellule à cellule par divers mécanismes : stimulation directe des récepteurs cibles, intégration des récepteurs

de surface dans une cellule cible. Les microparticules peuvent également transférer leur contenu cytoplasmique, y compris de l'ARN (Ratajczak et al., 2006), et moduler l'immunité adaptative en stimulant la réponse immunitaire (Sprague et al., 2008). Les microparticules jouent également un rôle majeur dans les processus pathologiques, tels que les infections, principalement par le transfert des récepteurs aux cellules cibles permettant l'entrée de virus. Dans les maladies systémiques, telles que la polyarthrite rhumatoïde, elles agissent par amplification de la réponse inflammatoire locale (Italiano et al., 2010). Les microparticules interviennent dans le développement de cancers en favorisant l'angiogenèse et l'invasion de cellules tumorales, et elles peuvent être des marqueurs prédictifs de la formation de métastase et de l'agressivité (Dovizio et al., 2018; Haemmerle et al., 2018; Plantureux et al., 2020).

Par ailleurs, les microparticules constituent des acteurs majeurs de l'hémostase et de la thrombose.

De par leur mécanisme de formation, la plupart des microparticules possèdent des propriétés procoagulantes grâce à la présence de phosphatidylsérine dans le feuillet externe de la membrane. Les propriétés procoagulantes de la phosphatidylsérine résident dans l'assemblage des facteurs de la coagulation par interaction avec leur domaine GLA permettant la formation des complexes tenase et prothrombinase notamment. Zubairova et coll. montrent que les phospholipides microparticulaires sont essentiels dans la polymérisation de la fibrine. En l'absence de microparticules, la génération de thrombine est quant à elle similaire (pic de thrombine et ETP) mais retardée (temps de latence et temps au pic). La présence de microparticules permet également de générer un caillot plus dense avec des fibres de fibrine plus fines, le rendant notamment plus résistant à la fibrinolyse (Zubairova et al., 2015). La principale source de microparticules exprimant la phosphatidylsérine est la plaquette. Ces dernières sont inconstamment associées à l'expression d'une autre molécule procoagulante, le facteur tissulaire. Il semble néanmoins que les microparticules plaquettaires expriment nativement peu le facteur tissulaire et que cette expression soit liée à la liaison de microparticules externes aux plaquettes (Owens and Mackman, 2011). Les leucocytes et plus précisément les monocytes de sujets sains expriment le facteur tissulaire. La stimulation des monocytes par le lipopolysaccharide entraîne une augmentation de l'expression et de la libération de microparticules exprimant le facteur tissulaire.

Le facteur tissulaire est essentiel à l'initiation de la coagulation, capable de former des complexes avec le facteur VII, facteur VII activé à l'origine de la formation de facteurs X et IX activés. A l'état physiologique, l'impact réel des microparticules exprimant le facteur tissulaire est néanmoins encore controversé. Des expérimentations *in vitro* ne montrent pas d'impact sur la quantité totale de thrombine générée, du fait d'une faible concentration (Ollivier et al., 2010). L'impact apparaît plus documenté dans les conditions pathologiques. Les microparticules exprimant le facteur tissulaire sont particulièrement présentes dans la plaque d'athérome et favoriseraient les thromboses artérielles suite à la rupture de la plaque (Mallat et al., 1999). Sur des modèles animaux des études montrent un impact global sur la coagulation. Dans des conditions pathologiques il apparaît que ces microparticules jouent un rôle dans la formation du thrombus, notamment grâce à un recrutement par l'intermédiaire de la sélectine P et du PSGL-1. L'activité du facteur tissulaire semble également concentrée au niveau du thrombus du fait de la liaison des microparticules monocytaires au fibrinogène présent au sein des agrégats plaquettaires (Owens and Mackman, 2011). Si les microparticules paraissent globalement procoagulantes, elles sont capables également d'exprimer, selon leur origine cellulaire, des molécules anticoagulantes et profibrinolytiques, ce type de propriétés ne surpassant pas leur impact procoagulant. Elles peuvent ainsi exprimer des anticoagulants physiologiques tels que le TFPI, la protéine C activée et des molécules clés de son activation que sont la thrombomoduline et l'EPCR. Elles peuvent également favoriser la génération de plasmine en se liant au tPA et à l'urokinase (Suades et al., 2015)

Par ailleurs, en raison de leur activité procoagulante, les microparticules sont un marqueur pronostique de choix dans les maladies cardiovasculaires (Boulanger et al., 2006; Kuriyama et al., 2010). En effet, leur concentration est augmentée après l'infarctus aigu du myocarde (Hartopo et al., 2016) particulièrement les sous-populations exprimant des marqueurs spécifiques, tels que sélectine P (van der Zee et al., 2006). Une notion de taille des microparticules semble aussi exister. Les microparticules de grandes tailles semblent plus fortement associées à l'athérosclérose carotidienne (Michelsen et al., 2009), l'infarctus du myocarde, ainsi qu'à la circulation du complexe thrombine-antithrombine et du ligand soluble CD40 (Michelsen et al., 2008), ces derniers étant corrélés avec un risque plus élevé d'événements cardiovasculaires (Heeschen et al., 2003). Les microparticules

plaquettaires semblent jouer un rôle clé dans les maladies cardiovasculaires en raison de l'expression des phospholipides et des marqueurs de surface procoagulants, et de leur capacité à recruter des leucocytes, à transférer des micro-ARN et à favoriser l'inflammation (Melki et al., 2017; Shantsila et al., 2010; Wang et al., 2016).

1.6 Exploration des microparticules

L'exploration des microparticules s'articule autour de 2 grands types de techniques. Des techniques pouvant allier détection spécifique, dénombrement et caractérisation antigénique des marqueurs de surface, telles que la cytométrie en flux et des techniques fonctionnelles capable par exemple de déterminer les propriétés procoagulantes globales des microparticules d'un échantillon.

1.6.1 La cytométrie en flux et autres techniques de caractérisation cellulaire

La cytométrie en flux est la technique les plus communément utilisée pour caractériser les microparticules (van der Pol et al., 2014). Elle permet l'étude des particules et cellules en suspension dans un milieu liquide en les faisant passer une à une devant un ou plusieurs faisceaux laser. Cette technique fournit de nombreuses informations, à savoir la taille de éléments grâce à la lumière diffractée dans l'axe du rayon laser et une estimation de la structure grâce à la lumière dispersée sur les côtés. Ces informations, si elles n'identifient pas formellement les types cellulaires, permettent un premier tri. Couplée à l'utilisation de fluorochrome, la cytométrie en flux permet l'identification d'éléments comme des glycoprotéines de surface ou des aminophospholipides de la membrane tels que la phosphatidylsérine. Du fait des développements technologiques récents, cette technique offre des bonnes performances. Le nombre de molécules analysées simultanément augmente régulièrement pour atteindre près d'une cinquantaine grâce aux capacités des cytomètres et au développement des fluorochromes. La mise en œuvre est en outre relativement rapide, réalisable sur de faibles volumes, la rendant disponible aussi bien en conditions de recherche que de diagnostic. Il est également possible de coupler cette technique à un trieur de cellules permettant de purifier un échantillon. Les principaux inconvénients résident dans la nature de l'échantillon, où les éléments doivent être en suspension. La résolution

des automates et la difficulté à caractériser correctement les microparticules de petites tailles se sont améliorées ces dernières années grâce aux évolutions technologiques et méthodologiques. De plus, bien que coûteux, des systèmes de billes calibrées permettent de déterminer une concentration en microparticules. Enfin, l'étude des microparticules a fait l'objet ces dernières années de tentatives de standardisation, tant sur le plan pré-analytique que méthodologique avec notamment des études multicentriques (Cointe et al., 2017; Lacroix et al., 2013, 2010; van der Pol et al., 2016).

D'autres techniques sont capables de caractériser les microparticules individuellement, certaines utilisant également des techniques de diffusion de la lumière comme le *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA). Cette technique permet grâce à un microscope de quantifier les microparticules mais sa caractérisation des populations est limitée par un plus faible nombre de lasers (Dragovic et al., 2011). La microscopie à force atomique est une technique capable d'analyser la topographie d'une surface à l'échelle atomique. Une pointe métallique balaye la surface de l'échantillon renseignant sur la concentration, la taille, voire même la nature de sous-populations en cas de couplage à un microscope à fluorescence (Siedlecki et al., 1999; Yuana et al., 2010).

1.6.2 Les tests fonctionnels

De manière complémentaire, il existe également des techniques renseignant sur les capacités fonctionnelles des microparticules. Le test de génération de thrombine peut être adapté pour refléter leur rôle procoagulant, les microparticules étant alors source de phospholipides, avec ou sans facteur tissulaire (Gheldof et al., 2014). Un test plus standardisé est disponible sur les coagulomètres utilisés en routine pour le diagnostic. Ce réactif STA®-Procoag-PPL dépourvu de phospholipides initie la coagulation d'un plasma dépourvu de plaquette, au niveau du facteur X. Le temps de formation du caillot, détecté par technique mécanique, devrait être dépendant des phospholipides microparticulaires.

Enfin des tests combinent une étape de capture des microparticules par l'annexine V via la phosphatidylsérine (Zymuphen MP-Activity), ou par le facteur tissulaire (ZYMUPHEN™ MP-TF) via un anticorps spécifique, à une étape fonctionnelle. Les microparticules sélectivement capturées vont ensuite être détectées par leur

capacité à générer un signal procoagulant en présence de divers facteurs : génération de facteur X activé, de thrombine, mise en évidence par un substrat fluorigène.

1.7 Physiologie de la fibrinolyse

La formation du caillot de fibrine suite à l'action combinée des acteurs de l'hémostase primaire et de la coagulation plasmatique permet d'obstruer la brèche vasculaire. Le saignement maîtrisé, l'élimination rapide du caillot et des dépôts de fibrine sont essentiels dans la régulation de l'hémostase. Ce processus enzymatique médié par la plasmine et autorégulé est contrôlé par le système fibrinolytique (Figure 17).

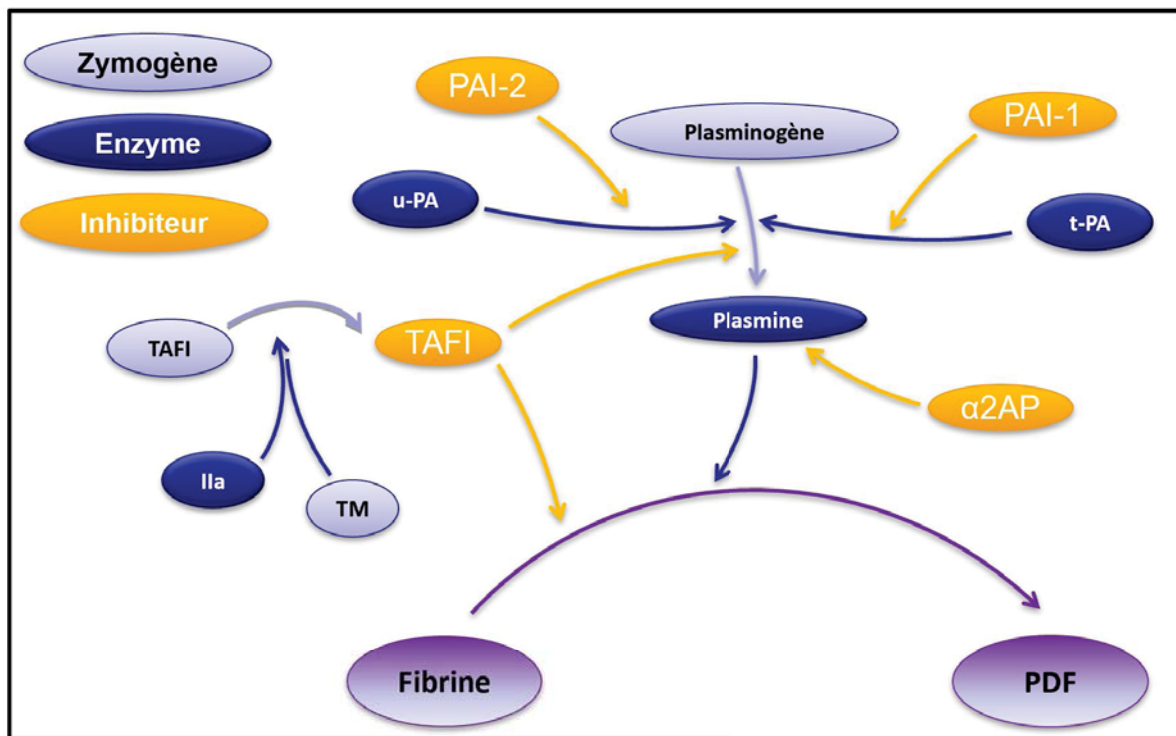


Figure 17 : Processus de fibrinolyse

TAFI, *thrombin-activable fibrinolysis inhibitor* ; PAI, *plasminogen activator inhibitor* ; Iia, thrombine ; TM, thrombomoduline ; PDF, produit de dégradation du fibrinogène et de la fibrine ; α2AP, alpha-2-antiplasmine ; t-PA, activateur tissulaire du plasminogène ; u-PA, urokinase.

1.7.1 Les facteurs profibrinolytiques

La plasmine résulte de l'activation de son zymogène, le plasminogène. Le plasminogène est synthétisé par le foie avec un acide glutamique N-terminal sous forme de Glu-plasminogène. C'est une glycoprotéine à chaîne simple de 92 kDa circulant à une concentration de 1,5 à 2,0 $\mu\text{mol/L}$. Il contient notamment 5 structures homologues en triple boucles permettant une liaison spécifique à la fibrine via des sites de liaison aux résidus lysine et l'interaction de la plasmine avec l' α 2-antiplasmine (Collen, 1980; Forsgren et al., 1987). L'activation du plasminogène bénéficie d'une régulation conformationnelle, le site de clivage étant naturellement masqué pour les activateurs. Une hydrolyse initiale de la liaison peptidique en Lysine77, régulée par la liaison à la fibrine, entraîne la formation de Lys-plasminogène. Celui-ci présente une structure plus linéaire rendant le site de clivage plus accessible. Le Lys-plasminogène est transformé en plasmine, une protéase à sérine à chaîne double, par clivage de liaison peptidique Arginine561 – Valine562. La plasmine possède une chaîne lourde impliquée dans les interactions avec les autres acteurs du système fibrinolytique tels que la fibrine ou l' α 2-antiplasmine alors que la chaîne légère est responsable de son activité catalytique. La production de plasmine par l'activateur tissulaire du plasminogène est faite *in situ* au contact du caillot par liaison à la fibrine par les résidus lysine. La fibrine dégradée par les premières traces de plasmine expose des résidus lysine supplémentaires et concentre localement les principaux acteurs du système fibrinolytique. En effet, la fibrine fournit une surface avec laquelle le plasminogène et son activateur forment un complexe ternaire cyclique amplifiant l'action de l'activateur tissulaire du plasminogène. Elle est protégée de l'action de l' α 2-antiplasmine (Hoylaerts et al., 1982; Law et al., 2012; Longstaff and Kolev, 2015; Medved and Nieuwenhuizen, 2003).

Le tPA, l'activateur tissulaire du plasminogène est le principal activateur du plasminogène. C'est une protéase à sérine synthétisée par les cellules endothéliales et sécrétée dans la circulation de manière continue ou libérée sous l'influence de divers stimuli tels que la thrombine, la bradykinine ou de contraintes de cisaillement (Angles-Cano et al., 1985; Kawai et al., 1996; van den Eijnden-Schrauwen et al., 1995). Il est initialement formé d'une chaîne de 527 acides aminés d'une masse moléculaire d'environ 70 kDa mais l'hydrolyse par la plasmine de la liaison peptidique en arginine275 – isoleucine276 forme une double chaîne

reliée par un pont disulfure (Hajjar, 2003; Pennica et al., 1983). Sa structure forme plusieurs domaines : (i) un domaine « finger » analogue à celui de la fibronectine responsable de l'affinité pour la fibrine ; (ii) un domaine analogue à l'EGF qui participerait aux actions non protéolytiques de l'activateur tissulaire du plasminogène, tel qu'un effet anti-apoptotique (Correa et al., 2011) ; (iii) deux structures en triple boucles présentant une homologie avec celle du plasminogène, responsables de l'affinité pour la fibrine (Ichinose et al., 1986) ; (iv) le site catalytique responsable de la transformation du plasminogène en plasmine.

L'activateur du plasminogène de type urokinase participe également à l'activation du plasminogène. Il est synthétisé par le rein, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les monocytes sous forme de pro-urokinase à chaîne unique de 54 kDa (Roychoudhury et al., 2006). Sa structure présente plusieurs domaines : (i) un domaine analogue à l'EGF, (ii) une structure en triple boucles similaire à celles du plasminogène et de l'activateur tissulaire du plasminogène hormis l'absence de site de fixation aux lysines induisant l'absence de liaison à la fibrine, et (iii) le site catalytique. La forme active, l'urokinase, constituée de 2 chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure, est formée par clivage de la liaison peptidique en lysine158 – isoleucine159 par la plasmine ou la kallikréine (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Kasai et al., 1985; Stump et al., 1986).

1.7.2 Les inhibiteurs physiologiques de la fibrinolyse

Les acteurs profibrinolytiques sont finement régulés par la présence d'inhibiteurs, présents aux différentes phases du processus.

L'alpha2-antiplasmine, le principal inhibiteur physiologique de la plasmine, est une protéase à sérine synthétisée par le foie sous forme d'une glycoprotéine à chaîne simple d'un poids moléculaire de 70 kDa (Holmes et al., 1987). Environ 30% de l'alpha2-antiplasmine circule sous une forme tronquée de 26 acides aminés en partie C-terminale de la chaîne entraînant une inhibition moindre de la plasmine. Elle forme initialement un complexe réversible avec la plasmine puis une liaison covalente est formée entre le site réactif en arginine376 – méthionine377 et le site actif de la plasmine qui perd ainsi son activité protéolytique (Aoki, 2005). L'alpha2-antiplasmine inhibe uniquement la plasmine circulante du fait de la nécessité d'une liaison covalente aux sites lysines des structures en triple boucles de la plasmine.

La plasmine liée au fibrinogène est protégée car les sites de fixation sont déjà occupés. Par ce mécanisme, L'alpha2-antiplasmine limite l'extension du processus fibrinolytique (Aoki, 2005; Carpenter and Mathew, 2008; Schaller and Gerber, 2011; Wiman and Collen, 1979).

Une phase d'inhibition existe également au niveau des activateurs du plasminogène, l'action du tPA et de l'urokinase étant contrôlée par les inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAI). Le PAI-1, est une protéase à sérine à simple chaîne d'environ 50 kDa synthétisée par les cellules endothéliales vasculaires, le tissu adipeux, le foie, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (Crandall et al., 1999; Knittel et al., 1996). Le PAI-1 est sécrété en réponse à divers stimuli notamment inflammatoires, incluant des cytokines, lipoprotéines ou facteurs de croissance (Hajjar, 2003). Il est également présent dans les plaquettes et circule dans le plasma sous forme active et complexée à la vitronectine (Declerck et al., 1988). Il existe 2 autres formes, inactive et latente. Le PAI-1 régule la fibrinolyse en inhibant rapidement le tPA et l'urokinase en agissant, lui aussi, comme substrat « piège » de ces molécules via la liaison peptidique arginine³⁴⁶ – méthionine³⁴⁷ de son site réactif (Binder et al., 2002).

Il existe également un deuxième inhibiteur des activateurs du plasminogène, le PAI-2 dont l'action sur l'urokinase est prédominante (Kruithof, 1988).

Le TAFI (Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor) est synthétisé sous forme de pré-pro-enzyme par le foie et les mégacaryocytes. Il est sécrété dans la circulation sous une forme de pro-carboxypeptidase possédant un domaine catalytique et un peptide d'activation en région N-terminale. Une fraction contenue dans les granules plaquettaires alpha est libérée lors de l'activation plaquettaire. L'activation du TAFI en TAFI activé est réalisée par clivage du peptide d'activation en arginine⁹² par la thrombine (Bajzar et al., 1995). Cette réaction est potentialisée quand la thrombine forme un complexe avec la thrombomoduline (Nesheim and Bajzar, 2005). La plasmine serait également capable d'activer le TAFI, dont la localisation au niveau du caillot permettrait de prévenir une fibrinolyse prématurée. Le TAFI activé exerce son activité anti-fibrinolytique en clivant les résidus lysine du fibrinogène limitant les possibilités de fixation du plasminogène au niveau du caillot et donc la formation de plasmine (Foley et al., 2013; Mutch et al., 2003).

1.8 Exploration de la fibrinolyse

Le développement de techniques d'évaluation de la fibrinolyse est moins avancé que pour les autres étapes de l'hémostase. Les outils nécessaires au diagnostic sont donc moins implantés dans les laboratoires d'analyses et essentiellement dévolus à la recherche. C'est néanmoins un enjeu majeur tant l'hypofibrinolyse que l'hyperfibrinolyse peuvent constituer des facteurs de risque de thrombose ou d'hémorragie (Longstaff, 2018). Si la plupart des acteurs de la fibrinolyse sont aujourd'hui quantifiables isolément, que ce soit en termes d'activité spécifique ou de dosage pondéral, aucun test global ne s'est imposé. Les principaux écueils résident dans la faible capacité fibrinolytique du sang à l'état basal engendrant des temps d'analyse inadaptés à la pratique courante ou nécessitant de modifier le système par ajout de tPA ou suppression des inhibiteurs. Par ailleurs les conditions pré-analytiques sont exigeantes du fait de l'action rapide du PAI-1 dans le prélèvement. Enfin, l'étude sur plasma occulte la composante fibrinolytique cellulaire.

Les tests globaux d'exploration s'articulent autour de la mesure du temps de lyse des euglobulines et la mesure du temps de lyse d'un caillot en sang total ou plasmatique, chacun ayant des avantages propres mais aucun ne constituant un véritable « gold standard ». Ces derniers sont peu sensibles, la durée de disparition du caillot durant plusieurs heures les rend inappropriés aux situations d'urgence. Ils explorent le fibrinogène, les molécules profibrinolytiques comme le tPA et le plasminogène et les inhibiteurs du processus.

L'étude globale de la fibrinolyse sur plasma peut être réalisée par des méthodes turbidimétriques reflétant la formation du caillot de fibrine (initiée par la thrombine ou le facteur tissulaire en présence de phospholipides et de calcium). La lyse est objectivée dans des conditions analytiques similaires mais avec ajout de tPA exogène. Les 2 courbes ainsi générées permettent de déterminer le potentiel fibrinolytique global et le temps de demi-lyse (He et al., 1999). Cette démarche a été appliquée à des conditions hypercoagulables et hyperfibrinolytiques et une standardisation du protocole a été proposée sous l'égide de l'ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*) (Pieters et al., 2018).

D'autres techniques associant la mesure de la génération de thrombine à celle de la génération de plasmine sont évaluées (Valke et al., 2020; van Geffen et al., 2011).

Néanmoins, l'étude sur plasma présente plusieurs inconvénients, notamment du fait de l'absence de cellule rendant le processus *in vitro* moins physiologique. En effet, la composante cellulaire permet la formation d'un caillot plus dense, moins accessible à la lyse par la plasmine notamment grâce aux globules rouges (Wohner et al., 2011). Les plaquettes ont également la capacité de moduler le processus par relargage d'inhibiteurs tels que le TAFI et le PAI-1 permettant la croissance locale du caillot ou favorisant l'activation du plasminogène par la phase contact via le polyphosphate plaquettaire (Carrieri et al., 2011; Mitchell et al., 2016). Les leucocytes quant à eux ont des propriétés profibrinolytiques à travers l'expression de récepteurs à la fois au plasminogène potentialisant son activation et également aux activateurs tels que l'urokinase. Par ailleurs des enzymes telles que l'élastase issues des polynucléaires neutrophiles sont capables d'inhiber le PAI-1 et l'alpha2-antiplasmine (Ilich et al., 2017).

La thromboélastographie qui repose sur la mise en évidence des propriétés viscoélastiques du caillot en sang total peut être une alternative plus rapide et adaptée aux situations d'urgence en biologie délocalisée pour la gestion notamment des hémorragies durant les chirurgies. Néanmoins, son intérêt dans la pratique clinique tant dans l'hyperfibrinolyse que dans l'hypofibrinolyse est encore débattue (Lampridou et al., 2020) et des efforts de standardisation sont nécessaires (Chitlur et al., 2011; Gall et al., 2017).

Enfin des techniques plus récentes émergent telles que la détermination de la capacité fibrinolytique globale sur sang total développée par Rijken et coll. (Rijken et al., 2008). Cette méthode, sensible notamment au taux de tPA, PAI-1 ou fibrinogène, mesure le taux de produit de dégradation de la fibrine dans le surnageant collecté après formation rapide d'un caillot par la thrombine.

L'hémostase à travers la rupture de son homéostasie est étroitement liée à la physiopathologie de nombreuses maladies non transmissibles telles que les maladies cardiovasculaires (Khodadi, 2020; Lebas et al., 2019; Lowe and Rumley, 2014; McGinn et al., 2016). Parallèlement, les évidences s'accumulent sur la relation entre l'alimentation, la santé et notamment la santé cardiovasculaire à

travers des effets antioxydants, sur la pression sanguine, les lipides (Grao-Cruces et al., 2021, p.; Lebas et al., 2019; Mullins and Arjmandi, 2021; Naveed et al., 2020) ainsi que sur les différentes étapes de l'hémostase (Pieters and de Maat, 2015; Rajaram, 2003).

2. L'épicatéchine

2.1 Classification et structure

Les polyphénols sont très largement répandus dans le règne végétal. Ils proviennent du métabolisme secondaire des végétaux et ils sont synthétisés par la plantes en réponse à un stress biotique ou abiotique (Figure 18).

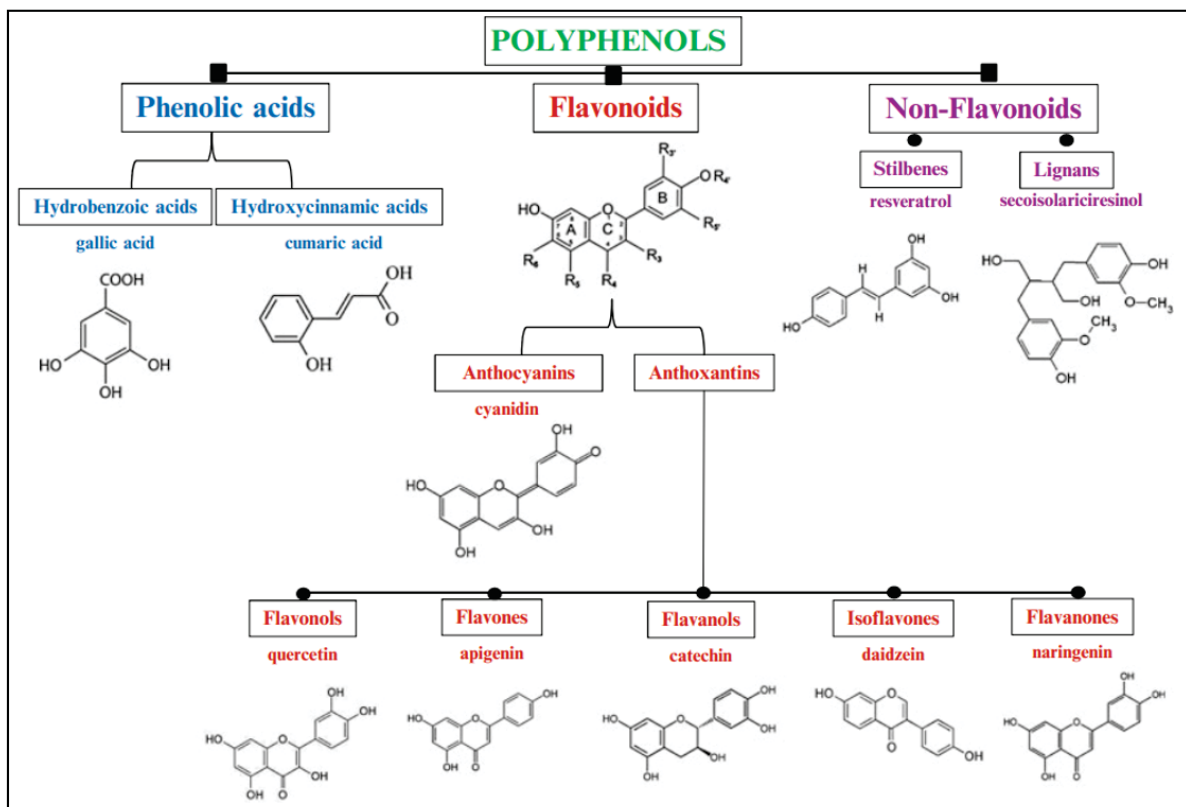


Figure 18 : Classification des polyphénols

D'après Jimenez-Del-Rio M. and Velez-Pardo C (2015). Natural Compounds as Therapeutic Agents for Amyloidogenic Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vassallo, N. (Ed.).

Ils comprennent une grande diversité de molécules structurellement distinctes, ce qui permet de les répartir en plusieurs familles dont celles des acides phénoliques et des flavonoïdes. Ils représentent près de la moitié des apports alimentaires. Du fait de leur distribution dans les aliments et du nombre croissant de données épidémiologiques, cliniques et expérimentales rapportant des effets bénéfiques sur la santé, un intérêt tout particulier est porté aux flavonoïdes. D'un point de vue structural, les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone C6-C3-C6 de structure phénylbenzopyrane. La position de la liaison entre le groupement benzopyrane et le cycle aromatique permet d'identifier 3 classes : les flavonoïdes (2-phénylbenzopyrane), les isoflavonoïdes (3-phénylbenzopyrane) et les néoflavonoïdes (4-phénylbenzopyrane) (Figure 19).

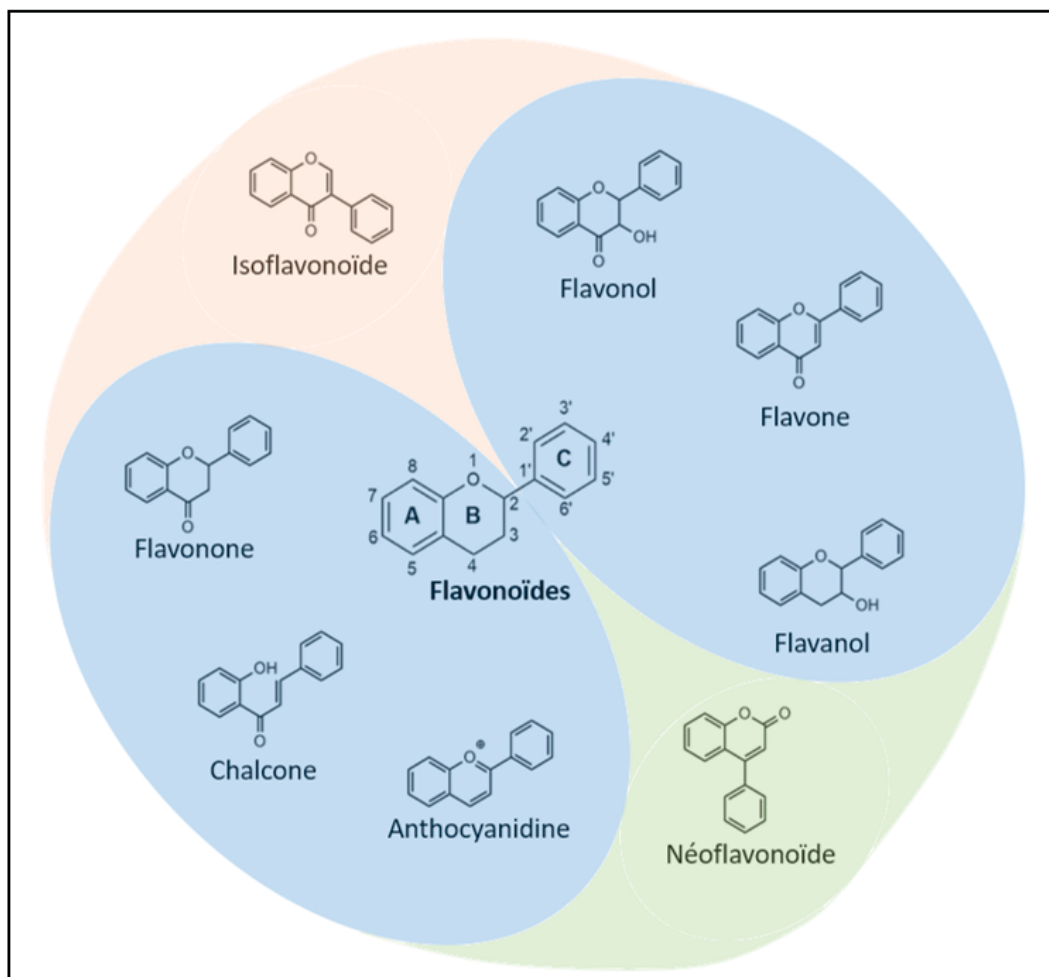


Figure 19 : Les différentes classes de flavonoïdes

Les flavanols, également appelés flavan-3-ols à cause de la position d'un groupe hydroxyle en position 3 du cycle C, sont la forme la plus réduite des flavonoïdes.

Chimiquement, ils diffèrent entre eux par leur stéréochimie, le degré d'hydroxylation du cycle C ainsi que le nombre de groupes.

Les flavonoïdes sont ensuite divisés en différentes sous-classes selon le degré d'oxydation et de saturation du cycle pyrane. On distingue ainsi principalement les flavones qui possèdent une double liaison en position 2-3 du cycle pyrane, les flavonols qui présentent en plus un groupement hydroxyle en position 3 ou encore les flavanols qui n'ont plus de fonction cétone en position 4 du cycle pyrane mais arborent une ou plusieurs fonctions hydroxyles en position 3 ou 4 du cycle.

Les flavan-3-ols, qui possèdent deux substitutions hydroxyles en position 5 et 7 du premier cycle benzène (A) et en position 4 et 5 du second cycle benzène (B), constituent l'une des classes les plus répandues et les plus abondantes de flavonoïdes. Les molécules de flavan-3-ols monomères, aussi appelées catéchines, comprennent quatre stéréoisomères en raison de la présence de 2 carbones asymétriques, les principaux étant la (+)-catéchine en configuration trans et la (-)-épicatéchine en configuration cis (Figure 20).

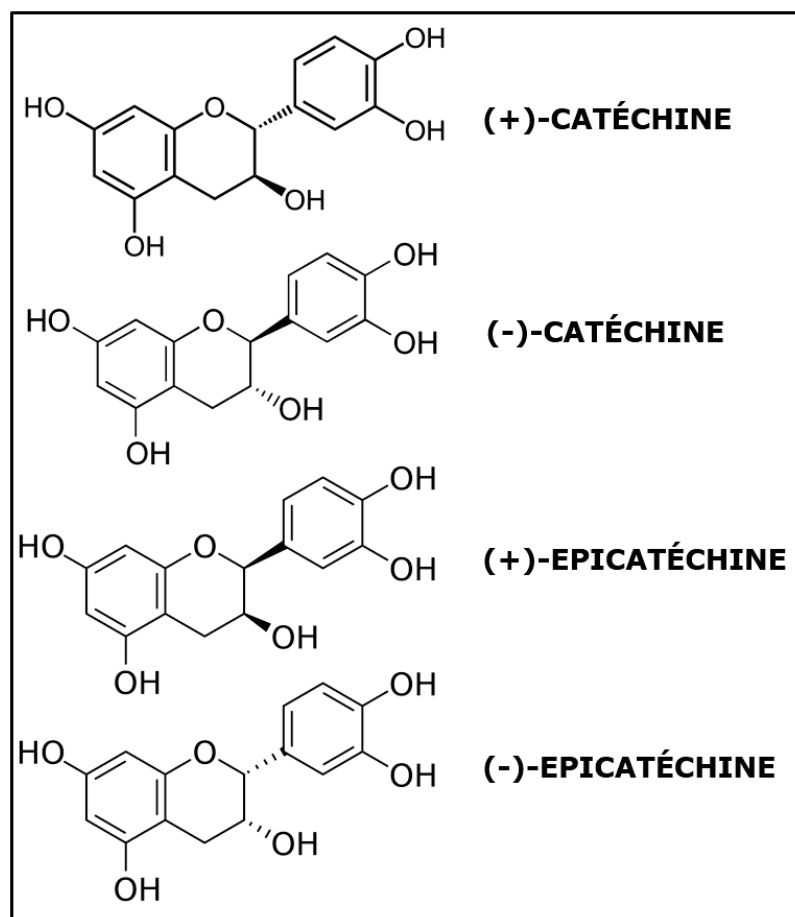


Figure 20 : Les différentes catéchines

Les flavonols sous forme polymérique forment les proanthocyanidines encore appelés tanins condensés, très abondants dans certains végétaux et leur conférant leurs propriétés astringentes. Les proanthocyanidines sont principalement constituées des procyanidines, dont les maillons sont la catéchine et l'épicatéchine, et des prodelphinidines formées de gallocatéchine et d'épigallocatéchine. Les dérivés galliques de l'épicatéchine sont par ailleurs les polyphénols les plus abondants du thé vert et supportent l'activité bénéfique (Almatroodi et al., 2020; Aron and Kennedy, 2008; Grotewold, 2008; Rauf et al., 2019).

2.2 Flavan-3-ols : aliments sources et niveau de consommation

Les flavan-3-ols sont ubiquitaires, présents dans la grande majorité des fruits et légumes, y compris les jus, et dans certaines céréales, l'épicatéchine étant souvent la molécule prépondérante. L'épicatéchine est un des monomères de catéchine, composé hydrosoluble régulièrement retrouvé dans le thé, la pomme, les fèves de cacao ou le raisin devant la catéchine et la procyanidine B2 (de Pascual-Teresa et al., 2010; Gu et al., 2004; Prior and Gu, 2005). De nombreux facteurs sont susceptibles de faire varier la teneur en épicatéchine des aliments et *in fine* d'affecter leurs propriétés biologiques, parmi lesquels on retrouve le type de transformation et le mode de consommation des aliments. Une épimérisation de la (-)-épicatéchine en (-)-catéchine peut survenir en cas de forte température (Payne et al., 2010). Les différents processus de fabrication du thé noir incluant notamment la fermentation engendrent une diminution importante de la teneur en épicatéchine (Lee et al., 2014). Généralement les taux en flavan-3-ols sont plus élevés dans les végétaux frais que dans les fruits secs ou cuits (Sanchez Silva et al., 2020). D'autres facteurs peuvent affecter les teneurs en catéchines, comme les conditions de pH et températures de stockage, la maturité, la variété (Aron and Kennedy, 2008).

Comme pour les autres polyphénols, les niveaux de consommation en flavan-3-ols varient selon le type d'alimentation et les préférences alimentaires mais on estime la consommation totale de flavan-3-ols, incluant les formes monomériques et polymériques, entre 0,1 et 0,5 gramme par jour (de Pascual-Teresa et al., 2010; Vogiatzoglou et al., 2015). Dans la population française, la cohorte SU.VI.MAX a estimé que la consommation en proanthocyanidines s'élevait à plus de 0,2 gramme

quotidiennement et celle des catéchines à 0,1 gramme (Pérez-Jiménez et al., 2011).

2.3 Biodisponibilité et métabolisme

A l'exception des monomères de flavan-3-ols, la plupart des flavonoïdes ne sont pas présents sous forme libre dans les aliments (forme aglycone) mais le plus souvent ils sont liés à des sucres (formes glucosides ou glycosides) ou bien entre eux pour donner des polymères (proanthocyanidines). La nature des formes ingérées conditionne le devenir des flavonoïdes dans la sphère intestinale, qu'il s'agisse des sites ou de l'efficacité d'absorption (Williamson et al., 2018). Les aglycones et les glucosides sont absorbés dans les parties hautes de l'intestin, tandis que les formes glycosides doivent atteindre le colon pour être hydrolysées en aglycone par les activités du microbiote intestinal avant d'être absorbées (Rios et al., 2002) (Figure 21). Ainsi dans le cas des flavan-3-ols, l'absorption des catéchines monomères (aglycone) qui ne nécessite pas d'hydrolyse préliminaire peut se faire directement au niveau de l'intestin grêle (Scalbert et al., 2002). Par contre, les proanthocyanidines (structure polymérique) s'accumulent au niveau du colon avant d'être éliminées. En effet, le microbiote intestinal ne possédant pas d'activités enzymatiques capables de les dépolymériser, les proanthocyanidines ne sont pas absorbées. Une autre particularité des polyphénols est d'être reconnus par l'organisme comme des xénobiotiques, ce qui implique que les molécules absorbées subissent au niveau des cellules intestinales puis hépatiques des conversions par des enzymes de conjugaison de phase II. *In fine*, ces réactions libèrent des métabolites glucuronidés, sulfatés et/ou méthylés qui sont ceux présents dans la circulation et qui atteignent les tissus (Figure 21) (Morand et al., 2000).

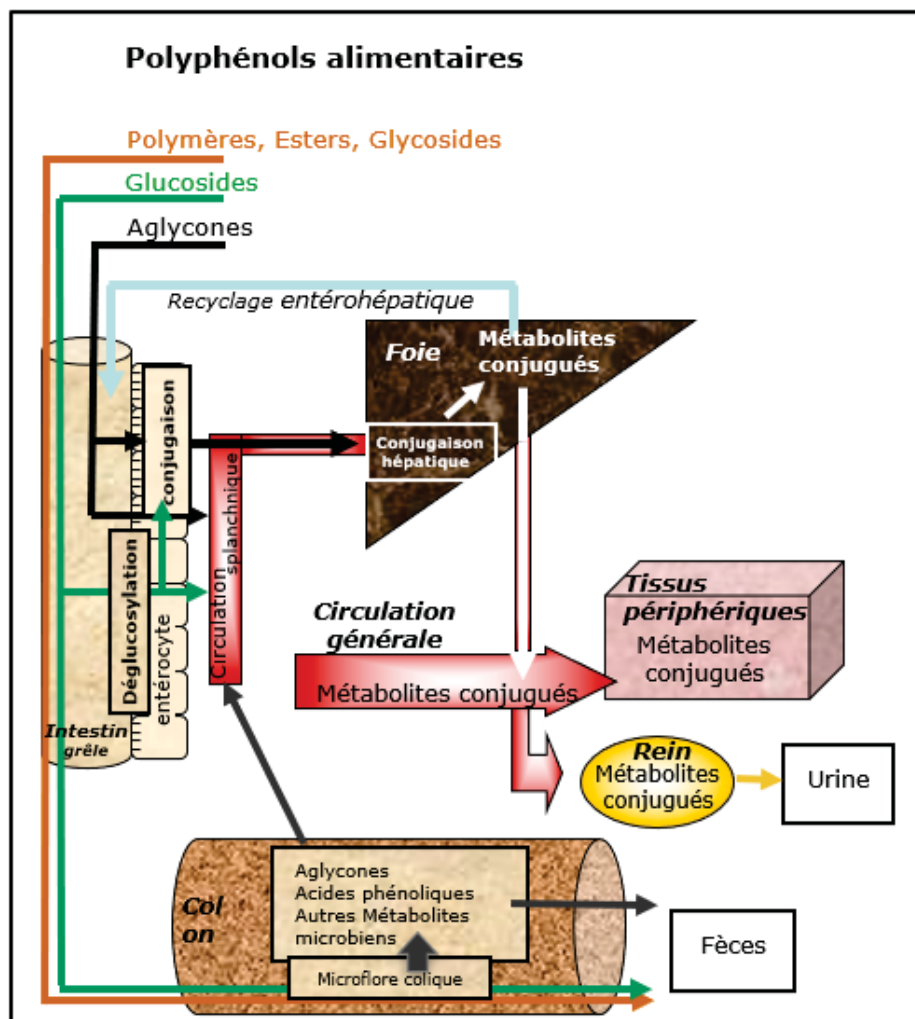


Figure 21 : Représentation schématique de l'absorption et du métabolisme des polyphénols.

Lors des premières investigations sur la biodisponibilité de l'épicatéchine, à la fin du 20^{ème} siècle, la compréhension de la pharmacocinétique des flavan-3-ols était limitée avec notamment une méconnaissance des métabolites circulants chez l'homme. Pour circonvenir cette limitation, les protocoles de quantification prévoyaient de dégrader les conjugués glucuronide et sulfate présents dans les fluides biologiques étudiés par un traitement glucuronidase/sulfatase afin de libérer l'épicatéchine avant de la doser par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection coulométrique. Rein et coll. montraient qu'après consommation de chocolat noir riche en procyanidines contenant 137 mg d'épicatéchine la concentration plasmatique s'élevait à 260 nmol/L à 2 heures (Rein et al., 2000a). Des résultats similaires étaient retrouvés sur l'épicatéchine

du thé (Lee et al., 1995). Ces procédés présentaient 2 inconvénients majeurs, l'impossibilité d'identifier les différents types de conjugués présents dans la circulation et une sous-estimation de la biodisponibilité de l'épicatéchine, les enzymes n'étant pas capables de dégrader tous les métabolites et notamment les dérivés méthylés (Borges et al., 2018).

Les connaissances sur la pharmacocinétique des flavan-3-ols ont progressé ces dernières années avec l'amélioration des techniques de détection et notamment la démocratisation de la spectrométrie de masse haute résolution couplée à la chromatographie liquide haute performance (Pereira-Caro et al., 2017). Cela a notamment permis la réalisation d'études sur la biodisponibilité de l'épicatéchine sans utiliser de glucuronidase/sulfatase et ainsi d'identifier ses principaux métabolites *in vivo* qui étaient l'épicatéchine-O-sulfate, l'O-méthyl-épicatéchine-O-sulfate et l'épicatéchine-O-glucuronide (Crozier et al., 2010; Mullen et al., 2009; Stalmach et al., 2009). Plusieurs limitations persistaient néanmoins, notamment la méconnaissance de la structure complète des métabolites, qui pouvait engendrer une quantification approximative en raison de l'absence de véritable référence. En effet, il est aujourd'hui connu que le métabolisme de l'épicatéchine peut engendrer les SREM (structurally related epicatechin metabolites) où le noyau flavanol est préservé et aussi des métabolites ayant une fission de l'anneau, qualifiés de RFM (ring fission metabolites), provenant du catabolisme par le microbiote intestinal (Ottaviani et al., 2012). Le développement de standards de synthèse relatifs à ces différents métabolites a également permis de surmonter ces limitations et de proposer au final des techniques précises et sélectives pour la quantification des métabolites de l'épicatéchine (Borges et al., 2018).

Les premières études utilisant cette méthodologie datent de 2012. Actis-Goretta et coll. montrent qu'après ingestion de chocolat noir contenant notamment 79 mg d'épicatéchine les métabolites les plus abondants dans la circulation sanguine sont l'(-)épicatéchine-3'- β -D-glucuronide, l'(-)épicatéchine 3' sulfate et la 3'-O-méthyl(-)épicatéchine 5-sulfate. Le pic d'absorption se situe à 3 heures après l'ingestion aux concentrations respectives de 290 nmol/L, 233 nmol/L et 153 nmol/L. Les métabolites de l'épicatéchine excrétés dans les urines sont retrouvés à hauteur de 58 μ moles, ce qui représente environ 20% de l'épicatéchine ingérée (Actis-Goretta et al., 2012). Natsume et coll. ont montré que l'un des principaux métabolites retrouvé était l'(-)épicatéchine-3'- β -D-glucuronide (Natsume et al.,

2003). D'autres études, concordantes, montrent qu'une consommation d'une boisson chocolatée contenant 138 mg d'épicatéchine engendre également comme principaux métabolites l'(-)-épicatéchine-3'- β -D-glucuronide, l'(-)-épicatéchine 3' sulfate avec une concentration maximale de 589 nmol/L et 331 nmol/L respectivement, 2 heures après l'ingestion (Ostertag et al., 2013). De plus, des 4 stéréoisomères l'(-)-épicatéchine apparaît comme celui ayant la meilleure biodisponibilité (Ottaviani et al., 2011). En effet, les mêmes auteurs démontrent l'importance de la configuration stéréochimique, les concentrations plasmatiques de l'épicatéchine-3'- β -D-glucuronide et de l'épicatéchine 3' sulfate étant respectivement 25 et 4 fois plus élevées pour l'(-)-épicatéchine que pour l'(+)-épicatéchine (Ottaviani et al., 2012).

La même équipe a montré en 2016 après ingestion de 60 mg d'épicatéchine radiomarquée que le profil plasmatique est biphasique avec une concentration maximale à 1 heure et un second pic à 6 heures, avec respectivement 1200 nmol/L et 950 nmol/L (Ottaviani et al., 2016). L'absorption de l'épicatéchine représente moins de 2% de l'épicatéchine ingérée et on observe une disparition à 72 heures de la circulation. L'élimination s'effectue à 85% dans l'urine, 10% dans les fèces, indiquant que la déposition dans les tissus représente moins de 5%. En témoignant d'une absence de stockage dans les tissus, ce résultat suggère que seule une consommation régulière d'épicatéchine peut permettre le maintien des taux circulants. L'analyse des métabolites confirme que les principaux métabolites retrouvés dans la circulation sont l'(-)-épicatéchine-3'- β -D-glucuronide, l'(-)-épicatéchine 3' sulfate et la 3'-O-méthyl(-)-épicatéchine 5-sulfate. Ces SREM constituent la majeure partie de l'épicatéchine retrouvée au pic à 1 heure et ont disparu à 8 heures indiquant une absorption par le duodénum. Les RFM (métabolites d'épicatéchine issus de l'activité du microbiote) ont une pharmacocinétique différente avec un pic à 6 heures et une demi-vie plus longue de l'ordre de 6 heures (Clifford et al., 2013; Ottaviani et al., 2016) (Figure 22). Par ailleurs, selon la capacité d'absorption du tractus gastro-intestinal les concentrations plasmatiques en métabolites de l'épicatéchine sont variables, la variabilité interindividuelle pouvant conduire à des taux circulants allant du simple au double (Borges et al., 2018; Rodriguez-Mateos et al., 2015).

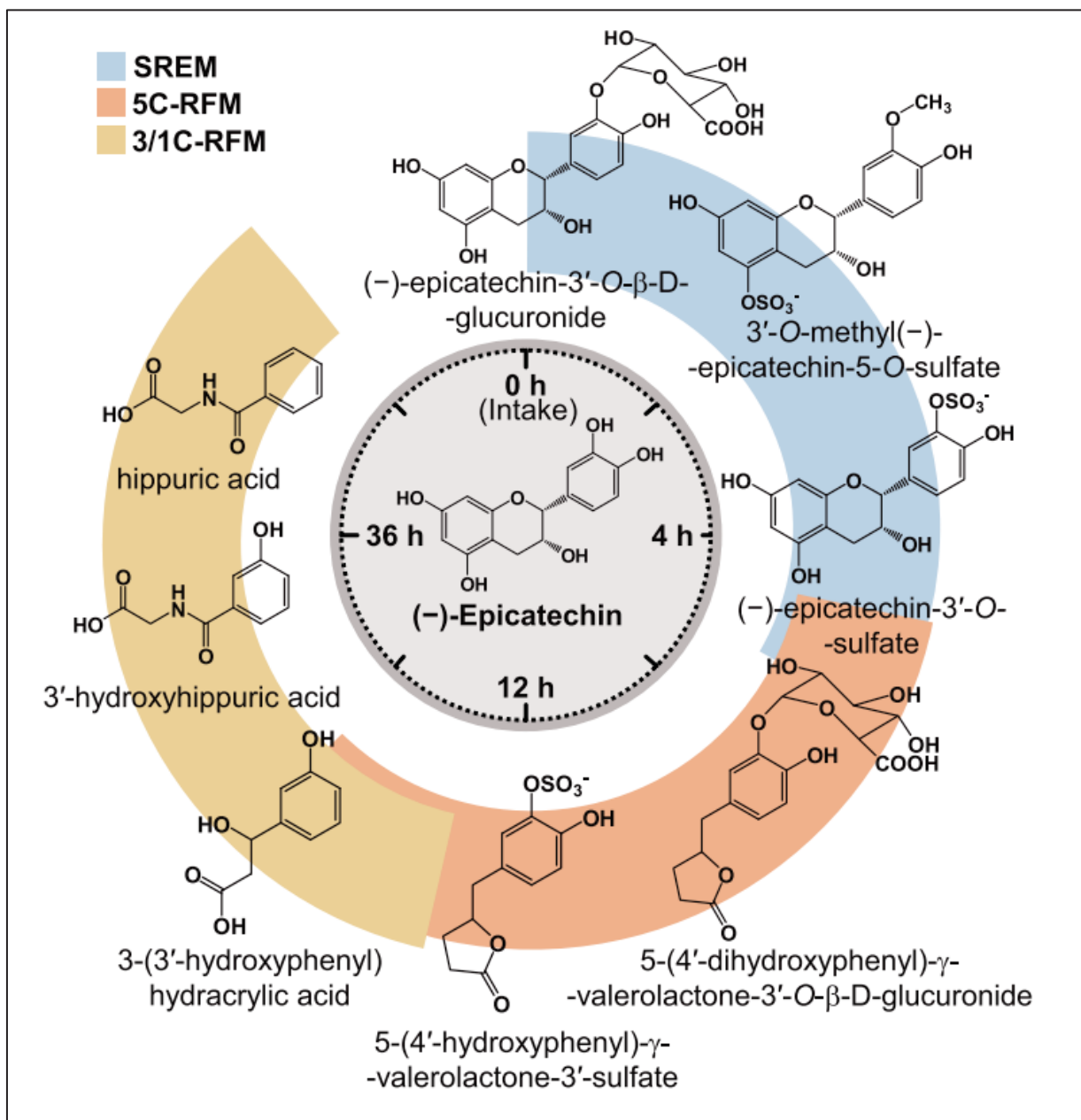


Figure 22 : Principaux métabolites retrouvés dans la circulation après ingestion d'épicatéchine.

D'après Ottaviani, J. I., Borges, G., Momma, T. Y., Spencer, J. P. E., Keen, C. L., Crozier, A., & Schroeter, H. (2016). The metabolome of [2-14C](-)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Scientific Reports*.

2.4 Propriétés biologiques

Les relations entre les maladies chroniques non transmissibles et l'alimentation ont été largement étudiées que ce soit dans le champ des cancers, des maladies cardiovasculaires ou encore du diabète (Lim et al., 2012; Micha et al., 2017). Une alimentation déséquilibrée surpasse tous les autres facteurs de risque à l'échelle mondiale (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015; GBD 2015 Risk Factors Collaborators, 2016). Parmi les facteurs de risque liés à l'alimentation, on retrouve notamment la faible consommation en fruits, légumes, noix et graines ("Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017," 2019).

Il y a eu depuis les années 1990 un intérêt croissant pour les flavonoïdes et leurs effets bénéfiques pour la santé, à travers des études épidémiologiques, notamment dans la mortalité cardiovasculaire (Hertog et al., 1993) ou le cancer (Hertog et al., 1994). Les données épidémiologiques se sont accumulées depuis et le rôle bénéfique des flavonoïdes a été confirmé (Arts and Hollman, 2005; Graf et al., 2005; Rodriguez-Mateos et al., 2014). Liu et coll. montrent dans une méta-analyse récente que, toutes causes confondues, la mortalité est plus faible chez les sujets consommant beaucoup de flavonoïdes (Liu et al., 2017). Ces derniers sont également associés à une diminution du risque cardiovasculaire avec notamment un risque relatif d'environ 0,90 pour les flavan-3-ols et proanthocyanidines (Wang et al., 2014). Ces données sont confirmées par Bondonno et coll. qui montrent que l'effet bénéfique des flavonoïdes sur la mortalité (globale, cardiovasculaire ou liée aux cancers) est dépendant des apports journaliers avec un plateau à partir de 500 mg par jour. (Bondonno et al., 2019). Enfin d'autres études ont pu démontrer qu'un apport élevé en flavonoïdes, y compris en flavan-3-ols, diminuait le risque de développer un diabète de type 2 (Xu et al., 2018) et avait un effet potentiellement bénéfique au niveau neurologique (Pontifex et al., 2021; Vauzour, 2017) .

Le stress oxydatif et l'inflammation, sont étroitement liés à la physiopathologie de ces maladies non transmissibles, menant notamment à l'oxydation des lipides et protéines, et à l'altération de l'ADN (Esser et al., 2014; Seyedsadjadi and Grant, 2020; Yang et al., 2020). L'épicatéchine est capable de réguler plusieurs mécanismes impliqués dans l'inflammation tels que la voie de signalisation de TNF-alpha et NF-κB (Bettaieb et al., 2014; Vazquez-Prieto et al., 2012), la

cyclooxygénase 2, l'interleukine-1 β (Lin et al., 2013), l'interleukine-6 (Prince et al., 2017). L'épicatechine est également capable de diminuer le stress oxydatif par diverses propriétés (Fraga et al., 2018; Higdon and Frei, 2003). *In vitro*, elle a une action antioxydante directe sur les espèces réactives de l'oxygène en donnant 2 électrons et se transformant en quinone (-)-épicatechine (Qu et al., 2020, p. 20520; Zhang et al., 2018). L'épicatechine augmente parallèlement la production de glutathion dans certains tissus, qui intervient dans le maintien du potentiel redox, et réduit la production d'espèces réactives de l'oxygène (Bahia et al., 2008; Simos et al., 2012). Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2 related factor) est un facteur de transcription clé dans la réponse antioxydante, l'inflammation ou l'apoptose. L'épicatechine est un régulateur des voies de signalisation impliquant Nrf2 (Fraga and Oteiza, 2011; Talebi et al., 2021). L'épicatechine est aussi impliquée dans la régulation de l'oxyde nitrique synthétisé par la NO synthétase qui est elle-même modulée par la NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxydase. Elle inhibe l'activité de la NADPH oxydase, restaure la biodisponibilité de l'oxyde nitrique et diminue le stress oxydant (Lassègue et al., 2012; Prince et al., 2019). L'impact bénéfique de l'épicatechine réside également dans sa capacité à favoriser la reprogrammation épigénétique de la signalisation cellulaire et contrôler l'inflammation systémique (Milenkovic et al., 2020).

Les études cliniques ont montré que l'épicatechine participe à la modulation des fonctions cardiovasculaires (Di Lorenzo et al., 2021) avec notamment une amélioration de la fonction endothéliale (flow-mediated dilation, FMD), (Parmenter et al., 2020) ou une diminution de la pression artérielle (Dower et al., 2016b, 2016a; Engler et al., 2004; Ried et al., 2012; Taubert et al., 2007). L'épicatechine est également connue pour améliorer les performances des muscles squelettiques (Li et al., 2020; Si et al., 2019), joue un rôle bénéfique dans la prévention du diabète de type 2, les cancers ou les atteintes neurologiques (Bernatova, 2018; Qu et al., 2020).

2.5 Rôles sur l'hémostase

Les effets bénéfiques de l'épicatechine dans de nombreux champs d'investigation ont été bien documentés y compris dans l'aire des maladies cardiovasculaires. Le système hémostatique joue un rôle clé dans de nombreux processus pathologiques tels que le potentiel thrombogène de la plaque athéromateuse (Ajjan and Grant, 2006; Allman-Farinelli and Dawson, 2005; Fuster et al., 2005). Néanmoins l'impact

de l'épicatechine sur le versant hémostasie qui participe à la pathogénicité de ses pathologies est encore peu étudié.

2.5.1 Impact de l'épicatechine sur l'hémostasie primaire

Parmi les trois étapes classiques de l'hémostasie, avec la coagulation et la fibrinolyse, l'hémostasie primaire est la plus largement étudiée. Les premières études datent de la fin du 20^{ème} siècle. Les méthodologies disparates rendent compliquées une comparaison des résultats. En effet, si le « gold standard » pour l'exploration des fonctions plaquettaires semble être le test d'agrégation plaquettaire, d'autres techniques telles que la cytométrie en flux ou la mesure du temps d'occlusion plaquettaire ont été utilisées. Il existe au sein même de ces techniques des protocoles différents en ce qui concerne la matrice utilisée, les agonistes plaquettaires ou leurs concentrations. On distingue par ailleurs les études *in vitro* employant de l'épicatechine, pure ou au sein d'un mélange de flavan-3-ols, des études *ex vivo* employant elles aussi ces différents types de méthodologies. Toutes ont pu montrer globalement un impact de l'épicatechine sur l'hémostasie primaire bien que parfois les résultats puissent être discordants.

Neiva et coll. ont montré que l'ajout *in vitro* d'épicatechine à un plasma riche en plaquettes ajusté à 250 G/L avec du plasma pauvre en plaquettes autologue diminuait l'agrégation plaquettaire maximale induite par l'ADP (3 μ M), l'acide arachidonique (300 μ M) et l'épinéphrine (6 μ M) à partir d'une concentration de 170 μ mol/L (Neiva et al., 1999). 100 μ M d'épicatechine inhibait l'agrégation plaquettaire sur sang total induite par le collagène (Heptinstall et al., 2006) tandis que 150 μ M et 1000 μ M d'épicatechine n'interféraient pas sur l'agrégation de plaquettes lavées, induite par la thrombine (2,4 nM) (M. Bijak et al., 2014a)

L'activation de la glycoprotéine plaquettaire IIb-IIIa sur sang total en réponse à l'ADP et l'épinéphrine (20 μ M) est inhibée 2 heures et 6 heures après la consommation de boissons chocolatées enrichies en épicatechine associée pour l'ADP à une diminution de l'expression de la sélectine P (Rein et al., 2000b, 2000c). La même équipe publie néanmoins des résultats partiellement différents avec une méthodologie similaire (Pearson et al., 2002). Une consommation de purée de pommes enrichie en épicatechine a elle engendré une diminution de la réactivité plaquettaire mesurée par l'expression de la glycoprotéine IIIa et de la sélectine P (Gasper et al., 2014). Kang et coll. confirment sur un mélange de catéchines (dont

l'épicatéchine) issues de thé vert l'inhibition de l'activation de la glycoprotéine plaquettaire IIb-IIIa par l'ADP par un mécanisme indirect limitant l'accroissement du calcium intraplaquettaire. Ils montrent également que l'agrégation plaquettaire induite par le collagène (50 µg/mL) et la thrombine (0.5 U/mL) en plus de l'ADP est diminuée, sur une suspension de plaquettes lavées (Kang et al., 2001). Par ailleurs, la consommation de chocolat noir ou l'épicatéchine (*in vitro*) sont capables de réduire le recrutement plaquettaire induit par le collagène (6 µg/mL) (Carnevale et al., 2012). Les travaux de Innes et coll. sur un plasma riche en plaquettes sont partiellement discordants. Ils montrent que le chocolat noir inhibe à 4 heures post-ingestion l'agrégation induite par le collagène mais pas par l'ADP à 0.5, 1 ou 2 µM (Innes et al., 2003). D'autres sources importantes d'épicatéchine telles que les extraits d'*Aronia melanocarpa* sont capables d'inhiber de manière dose dépendante l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine (Bijak et al., 2013). La matrice au sein de laquelle se trouve l'épicatéchine joue un rôle important, les effets sur la fonction vasculaire notamment pouvant être différents si les sujets ingèrent du chocolat ou de l'épicatéchine pure (Dower et al., 2016b).

Ces données sont confirmées par d'autres études utilisant d'autres techniques telles que la mesure du temps d'occlusion plaquettaire à l'ADP et à l'épinéphrine, tous deux pouvant être allongés après l'ingestion de chocolat contenant de l'épicatéchine, que ce soit en prise aigue ou après une consommation au long cours (Bordeaux et al., 2007; Holt et al., 2002; Montagnana et al., 2018; Ostertag et al., 2010; Pearson et al., 2002).

L'impact d'une consommation régulière sur 4 semaines d'épicatéchine à faible dose a été étudié. Au terme de l'étude la concentration d'épicatéchine avait doublé passant de 64 nmol/L à 116 nmol/L. Une diminution de l'agrégation plaquettaire sur sang total induite par l'ADP (8 µM) et le collagène (2 µg/mL) a été mise en évidence au contraire de l'acide arachidonique (1 mM). Il était également observé une diminution de l'expression de la sélectine P en réponse à l'ADP (Heptinstall et al., 2006; Murphy et al., 2003).

Au final, en dépit des différentes techniques utilisées et des méthodologies disparates au sein de celles-ci, il apparait que les flavan-3-ols et notamment l'épicatéchine sont capables de moduler l'hémostase primaire. Cependant, le rôle spécifique de ces composés mérite d'être approfondi ainsi que les mécanismes mis en jeu, notamment les voies d'activation plaquettaire initiées par les différents

agonistes. Ces données sont parfois encore discordantes dans la littérature, probablement du fait de la variabilité des méthodologies. Il apparaît nécessaire d'explorer l'hémostase primaire avec le test encore considéré comme le *gold standard*, l'agrégation plaquettaire aux agonistes en utilisant une méthodologie standardisée (Cattaneo et al., 2013).

2.5.2 Impact de l'épicatechine sur la coagulation plasmatique

Les études menées depuis plusieurs années ont prouvé que les extraits de plantes avaient non seulement des propriétés antiplaquettaires mais aussi anticoagulantes (Chua and Koh, 2006). Certains polyphénols notamment, semblent posséder une activité inhibitrice dirigée contre les protéases à sérine qui constituent la majorité des enzymes de la coagulation (Massimiliano Cuccioloni et al., 2009).

Les extraits riches en polyphénols contenant de l'épicatechine tels que ceux issus des pépins de raisin ou d'*Aronia melanocarpa* étaient capables *in vitro* et de manière dose dépendante d'allonger le temps de céphaline avec activateur, le temps de Quick et le temps de thrombine. La vélocité de la thrombine (5 nM) dans la polymérisation de la fibrine était diminuée tout comme l'activité amidolytique de la thrombine (7,5 nM) (Bijak et al., 2011; Sikora et al., 2014).

La même équipe mettait en évidence que l'épicatechine pure causait une inhibition de l'activité amidolytique de la thrombine (15.8 nM), la concentration nécessaire pour inhiber la thrombine à 50% étant de 150 μ M. A l'inverse, l'épicatechine n'impactait pas la vélocité de polymérisation de la fibrine induite par la thrombine (10,4 nM) (M. Bijak et al., 2014a). Deux autres équipes ont montré que l'épicatechine *in vitro* n'impactait pas le temps Quick, le temps de céphaline avec activateur ou le dosage de fibrinogène (Liu et al., 2010; Neiva et al., 1999), mais allongeait les temps de coagulation déclenchés par les venins de serpents (Cesar et al., 2020). Néanmoins les résultats des études sont difficilement comparables du fait des matrices utilisées (plasma, système contenant du fibrinogène...) et des variations dans la méthodologie pour évaluer les différents paramètres (concentration en thrombine, longueur d'onde, capacité à cliver le fibrinogène ou activité amidolytique...).

L'épicatechine pourrait agir comme un inhibiteur réversible de la thrombine avec une constante de dissociation variable selon les techniques mais de l'ordre de 300

μM soit 10 000 fois plus élevé que pour l'argatroban, un inhibiteur direct (Massimiliano Cuccioloni et al., 2009; M. Cuccioloni et al., 2009; Mozzicafreddo et al., 2006).

D'un point de vue structural, certaines caractéristiques structurales des polyphénols apparaissent importantes dans l'inhibition des protéases à sérine. La position de la liaison entre le groupement benzopyrane et le cycle aromatique : les flavonoïdes (2-phénylbenzopyrane) ont une structure plus favorable à l'interaction que les isoflavonoïdes (3-phénylbenzopyrane). Les groupements hydroxyles en positions 3 du cycle C, en 5 et 7 du cycle A et en 3' (ou 5') et 4' du cycle B améliorent également les capacités inhibitrices des polyphénols vis-à-vis de la thrombine, de même que le groupement carbonyle en position 4 du cycle C (Shi et al., 2012). A l'inverse, des fonctions encombrantes sur le cycle B ou en position 3 du cycle C telle que la glycosylation diminuent l'affinité pour la thrombine (Massimiliano Cuccioloni et al., 2009).

Li et coll. ont mis en évidence que les cycles A, B et C interagissaient respectivement avec les poches S3, S1 et S2 de thrombine. Il a été émis l'hypothèse que les résidus hydroxyles en 3' (ou 5') et 4' du cycle B imitent le résidu arginine présent dans la poche P1 des substrats de la thrombine et forment des liaisons hydrogène avec des acides aminés formant la poche S1 (M. Bijak et al., 2014a; Bijak et al., 2016; Polack, 2003). D'autres expériences de *docking* ont mis en évidence que la conformation de l'épicatéchine pour la liaison à la thrombine est similaire à celle de l'argatroban. L'épicatéchine se situait au niveau du site actif et interagissait avec les résidus Histidine 57 (liaison de Van der Waals) et surtout Sérine 195 (liaison hydrogène), traduisant probablement une activité inhibitrice de la thrombine (Li et al., 2018) (Figure 23).

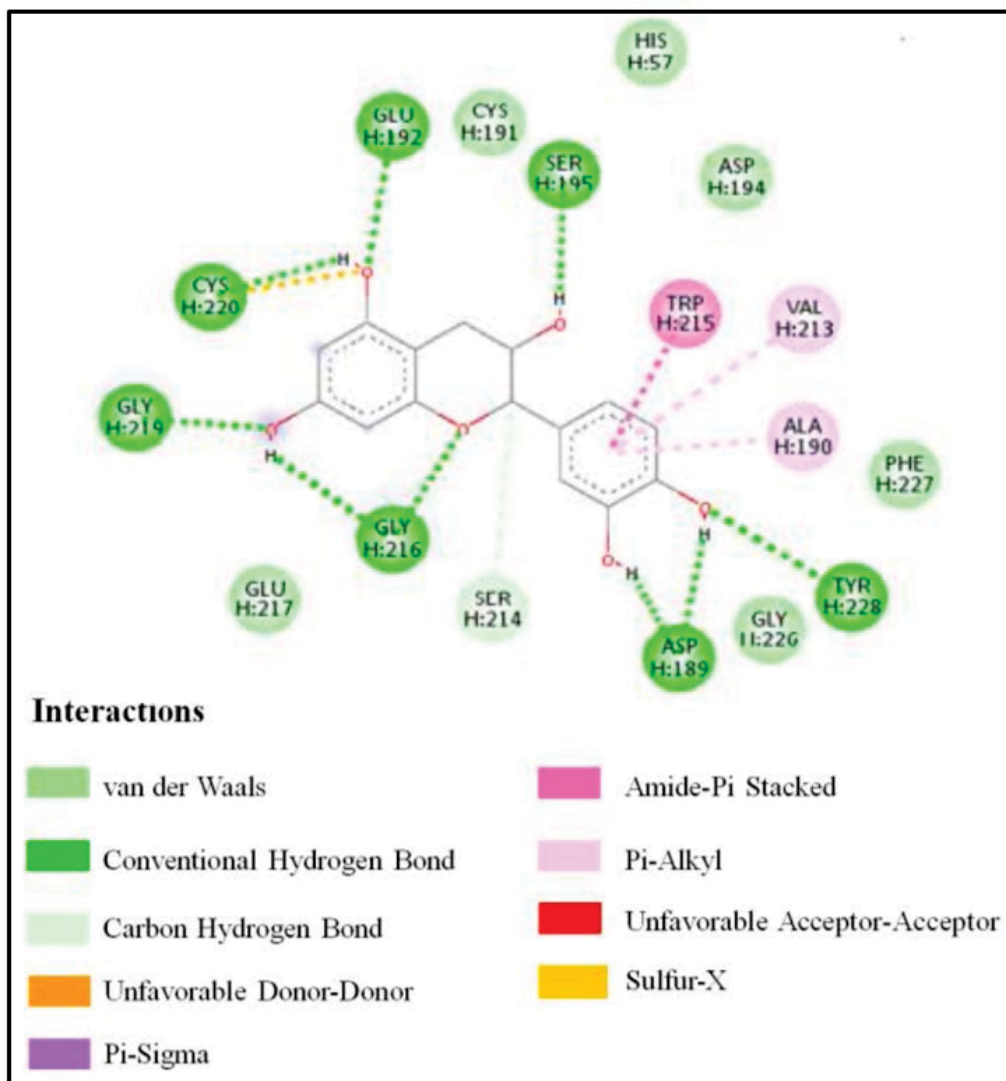


Figure 23 : Diagramme des interactions de l'épicatéchine avec les résidus de la thrombine

D'après Li, Q.-Q., Yang, Y.-X., Qv, J.-W., Hu, G., Hu, Y.-J., Xia, Z.-N., & Yang, F.-Q. (2018). Investigation of Interactions between Thrombin and Ten Phenolic Compounds by Affinity Capillary Electrophoresis and Molecular Docking. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*.

Il existe peu d'informations sur la capacité de l'épicatéchine à inhiber la facteur X activé. Néanmoins la procyanidine B2, un dimère d'épicatéchine a un effet inhibiteur dose dépendant sur son activité amidolytique. L'analyse informatique montre un encombrement du site actif de la molécule qui empêcherait l'accès des substrats à la sérine 195 (Michal Bijak et al., 2014; Pereira and Brazón, 2015).

Par ailleurs, l'épicatéchine n'est pas capable d'inhiber l'induction du facteur tissulaire à partir de monocytes stimulés en culture cellulaire par le lipopolysaccharide (Carrieri et al., 2013; Kaur et al., 2007)

Von Känel et coll. ont pu montrer sur une épreuve de stress après administration de chocolat noir que des taux plasmatiques élevés d'épicatéchine étaient associés à une plus faible production de d-dimères (von Känel et al., 2014). Enfin, l'épicatéchine en condition de stress oxydatif a la capacité de protéger le fibrinogène des modifications de structure induites par le peroxy-nitrite et donc d'enrailler son effet prothrombotique (Bijak et al., 2012).

Les données disponibles dans la littérature sur la structure du caillot de fibrine sont lacunaires. En effet, à notre connaissance plusieurs flavonoïdes et notamment les flavones et les flavanols ont été étudiés, mais il n'existe pas de donnée sur les flavan-3-ols et donc sur l'épicatéchine. Par exemple, la lutéoline, la rutine ou le kaempferol sont capables de diminuer la densité, l'absorbance maximale du caillot de fibrine ou la polymérisation de la fibrine (Choi et al., 2015a, 2015c, p. 201, 2015b).

Au final, si l'épicatéchine possède une structure chimique en théorie capable d'interagir avec les protéases à sérine de la coagulation, elle ne semble pas être le flavonoïde ayant le plus d'impact dans les études de liaison (Wang et al., 2020). D'un point de vue fonctionnel, peu de données sont disponibles sur la capacité de l'épicatéchine à jouer un rôle tout au long du processus de coagulation. Les seuls tests classiques de mesure de temps de coagulation semblent insensibles à la présence d'épicatéchine, mais il est communément admis leur inefficacité pour mettre en évidence des variations discrètes ou complexes (facteurs procoagulants et anticoagulants). Il apparaît donc nécessaire d'évaluer l'impact de l'épicatéchine tout au long du processus de coagulation plasmatique par l'utilisation de techniques globales intégrant à la fois les facteurs procoagulants et anticoagulants mais également la composante cellulaire du processus.

2.5.3 Impact de l'épicatéchine sur les microparticules

L'impact de l'alimentation sur l'activation cellulaire est connu depuis longtemps mais son rôle spécifique sur la libération, le phénotype et l'activité des

microparticules fait partie des données émergentes (Badimon et al., 2018). Les données disponibles sont parcellaires dans le sens où à notre connaissance seule une alimentation donnée ou des extraits alimentaires spécifiques ont été étudiés et non l'épicatechine elle-même (Ed Nignpense et al., 2019).

Olas et coll. ont montré *in vitro* que l'extrait de pépins de raisins contenant majoritairement des flavanols inhibe la formation de microparticules plaquettaires induites par le TRAP ou la thrombine (Olas et al., 2012a). *Ex vivo*, une alimentation enrichie en polyphénols issus de l'avoine pendant 8 semaines chez des patients diabétiques engendre une diminution des concentrations en microparticules plaquettaires exprimant le fibrinogène ou le facteur tissulaire et en microparticules monocytaires (Zhang et al., 2014). Il a été montré qu'après consommation par des sujets sains d'une boisson chocolatée enrichie en épicatechine le nombre de microparticules plaquettaires détectées par le CD42a (glycoprotéine IX) est diminué à 2 heures et 6 heures. Néanmoins les événements retenus comprennent tous les éléments de taille inférieure à 2 µm donc potentiellement les exosomes et les corps apoptotiques, en sus des microparticules (Rein et al., 2000c). Après 1 mois de consommation par des patients atteints de coronaropathies, les flavanols du chocolat induisent une diminution de la concentration des microparticules endothéliales détectées par le marquage CD144 + ou CD31 + / CD41 -. Néanmoins, dans cette étude, la concentration des microparticules plaquettaires détectées par le CD41 + n'est pas affectée. Il en est de même pour le potentiel procoagulant qui est évalué par un test associant incubation d'un culot de microparticules resuspendues et mélangé à du facteur VII et X en excès et révélation par un substrat chromogénique du facteur X activé (Horn et al., 2014). Enfin, chez les femmes en surpoids la concentration en microparticules endothéliales CD144 + diminue également après consommation de chocolat pendant 28 jours (McFarlin et al., 2015).

Au final, il apparaît important de déterminer l'impact propre de l'épicatechine sur la formation et le phénotype des microparticules.

2.5.4 Impact de l'épicatéchine sur la fibrinolyse

Il existe encore peu de données sur l'impact de l'épicatéchine sur le processus de fibrinolyse.

Il a été montré que la Browplasminin, un tanin condensé à prédominance procyanidine issu de *Brownea grandiceps*, diminue l'activité amidolytique et fibrinolytique de la plasmine de manière dose dépendante (Pereira et al., 2017; Pereira and Brazón, 2015). *In vitro*, l'extrait d'*Aronia melanocarpa* inhibe l'activité de la plasmine qu'elle soit induite par le tPA ou l'urokinase (Sikora et al., 2014).

Chez le rat nourri pendant plusieurs semaines avec un régime hypercalorique, l'épicatéchine diminue la concentration de PAI-1 circulant, traduisant *in vivo* un effet profibrinolytique (Rabadán-Chávez et al., 2016).

En culture cellulaire, l'incubation d'extrait de thé vert riche en polyphénols et notamment en catéchines diminue l'expression et la sécrétion de PAI-1 de manière dose dépendante. La voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase / protéine kinase Akt semble être impliquée dans le processus (Liu et al., 2009). Sur fibroblastes, un extrait de polyphénols diminue l'expression d'urokinase et de PAI-1 de manière dose dépendante (ARN et protéine) aboutissant à une diminution de l'activité fibrinolytique de la plasmine (Sandra et al., 2010). A l'inverse sur culture d'HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), l'épicatéchine amplifie la transcription des gènes du tPA et de l'urokinase, augmentant les taux d'ARN messager, ce qui aboutit à la surface cellulaire à une activité fibrinolytique majorée (Abou-Agag et al., 2001).

Par ailleurs, l'épicatéchine en condition de stress oxydatif présente des propriétés profibrinolytiques en préservant le plasminogène de l'inactivation. En effet, le peroxy-nitrite a la propriété de réduire la conversion du plasminogène en plasmine et donc de diminuer la fibrinolyse. L'épicatéchine est capable de contrer l'effet inhibiteur du peroxy-nitrite (Kolodziejczyk-Czepas et al., 2015).

Au final, l'épicatéchine ou plus largement certains polyphénols semblent impacter le système de la fibrinolyse en modulant à la fois les activateurs et les inhibiteurs tout en ayant une action directe sur la molécule clé, la plasmine. Cependant les conséquences peuvent apparaître discordantes selon les études, avec un rôle

parfois profibrinolytique, parfois anti-fibrinolytique. Une explication peut résider dans la diversité des méthodologies utilisées telles que l'origine de l'épicatéchine (extrait végétal, molécule purifiée), la matrice utilisée (plasma, culture cellulaire) ou le type d'étude (*in vitro*, *in vivo*). Néanmoins, l'épicatéchine semble intervenir à différents niveaux, de l'expression à la sécrétion des protéines jusqu'à un impact potentiellement direct sur l'activité enzymatique des facteurs pro ou anti-fibrinolytiques, ce qui pourrait également expliquer les résultats parfois discordants. Au final, l'impact global de l'épicatéchine sur le système fibrinolytique, y compris *in vitro* demeure incertain. Une étude du processus dans son ensemble par une technique prenant en compte la majorité des facteurs profibrinolytiques comme anti-fibrinolytiques permettrait de définir la résultante globale à toutes les modifications engendrées par l'épicatéchine.

OBJECTIFS

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier l'impact de l'épicatéchine, un flavonoïde majeur appartenant au groupe des flavan-3-ols, sur l'hémostase.

Dans une première partie, axée sur les 3 principales étapes de l'hémostase, il a été défini l'impact de l'épicatéchine sur l'hémostase primaire, la coagulation plasmatique et la fibrinolyse (Publication n°1). Les mécanismes en jeu dans ces processus sont finement régulés afin de maintenir un équilibre en condition physiologique, notamment entre les activateurs et les inhibiteurs. De ce fait, la résultante globale, complexe, ne peut pas être simplement déterminée en évaluant l'impact de l'épicatéchine sur l'expression des gènes ou des protéines en question. Les données actuelles se heurtent, du fait de l'utilisation de tests parcellaires, à cette limitation. Dans cette première partie, nous avons donc entrepris de déterminer le phénotype hémostatique en réponse à l'épicatéchine en privilégiant l'utilisation de tests globaux capables de mimer au mieux chacun des processus *in vivo* en intégrant un maximum d'effecteur.

Dans une deuxième partie nous nous sommes intéressés aux microparticules, considérées aujourd'hui comme de véritables acteurs de la physiologie de l'hémostase et dont l'implication dans la physiopathologie de nombreuses maladies est de plus en plus démontrée. Nous nous sommes attachés à définir l'impact de l'épicatéchine sur plusieurs points. Dans un premier temps, il s'est agi de déterminer son éventuel effet sur la formation et la libération des microparticules pour ensuite pouvoir dégager un phénotype membranaire. Enfin nous avons étudié les propriétés fonctionnelles procoagulantes inhérentes à la composition de leur membrane et à la présence de protéines de surfaces (Publication n°2).

Dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés à l'étape ultime du processus d'hémostase, la fibrinoformation et la constitution du caillot. La structure et les propriétés de ce dernier sont d'un intérêt crucial dans la gestion des pathologies thrombotiques, qu'elles soient artérielles ou veineuses. En effet, une altération du caillot de fibrine peut impacter le pronostic, la survenue de complications ou l'efficacité de l'anticoagulation. Une étude de l'impact de l'épicatéchine sur la structure et les fonctions du caillot de fibrine a donc été entreprise (Publication n°3).

RESULTATS

Publication n°1

« Epicatechin influences primary hemostasis, coagulation and fibrinolysis »

T. Sinigre, D. Teissandier, D. Milenkovic, C. Morand, A. Lebreton

Food and Function, 2019 Nov 1;10(11):7291-7298

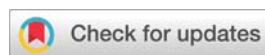
doi: 10.1039/c9fo00816k

Résumé

Les principales étapes de l'hémostase, c'est-à-dire l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse, sont impliquées dès les étapes précoces de l'athérombose. Certains effets bénéfiques des flavan-3-ols en lien avec ce processus pathologique sont bien documentés et incluent notamment la vasodilatation ou la diminution de la pression sanguine. Récemment il a été suggéré que l'épicatéchine pouvait interférer avec des molécules et des cellules impliquées dans les trois étapes de l'hémostase. Cependant ces processus sont finement régulés avec une balance entre les activateurs et les inhibiteurs physiologiques. Cet équilibre complexe ne peut néanmoins pas être exploré par la simple détermination de l'expression des gènes ou des protéines impliqués. Le but de cette étude était d'étudier l'effet de l'épicatéchine, un flavonoïde appartenant aux flavan-3-ols, sur le phénotype hémostatique à l'aide de tests *in vitro*, globaux, cliniquement pertinents qui imitent la complexité des différents processus de l'hémostase *in vivo*. Des échantillons de plasma provenant de 10 volontaires sains ont été enrichis avec des concentrations croissantes d'épicatéchine (1, 10 et 100 μM). L'effet de l'épicatéchine sur l'hémostase primaire, la coagulation plasmatique et la fibrinolyse a été évalué en mesurant respectivement l'agrégation plaquettaire en réponse à différents agonistes par évaluation de la transmission lumineuse, la génération de thrombine et le temps de lyse du caillot.

L'épicatéchine (100 μM) a diminué de manière significative l'agrégation plaquettaire maximale induite par l'adénosine diphosphate (-39%), le peptide activateur du récepteur de la thrombine (-48%), l'épinéphrine (-30%) et le collagène (-30%). Le potentiel de thrombine endogène était significativement réduit à partir de 1 μM d'épicatéchine, passant de 1548 ± 241 nM.min pour le contrôle à 1332 ± 230 nM.min avec l'épicatéchine ($p < 0,01$). La fibrinolyse a été accélérée par l'ajout *in vitro* d'épicatéchine avec une diminution du temps de lyse du caillot de 16 et 33% respectivement, pour les concentrations en épicatéchine de 10 et 100 μM (par rapport au contrôle : 1271 ± 775 s).

Ces résultats confirment que l'épicatéchine *in vitro* impacte les trois principales étapes de l'hémostase. Elle est capable d'inhiber à forte concentration (100 μM) l'agrégation plaquettaire induite par plusieurs agonistes traduisant un effet potentiel sur une portion commune de ces voies d'activation ou un effet lié aux propriétés antioxydantes de l'épicatéchine. Elle conduit également à une diminution de la formation totale de thrombine matérialisant un effet global sur le processus de coagulation plasmatique lorsque les principaux facteurs procoagulants et anticoagulants sont évalués. Enfin, la dégradation du caillot de fibrine survient plus rapidement en présence d'épicatéchine montrant globalement un impact profibrinolytique. Celui-ci peut avoir pour origine une interférence de l'épicatéchine dans la constitution du caillot ou un effet direct lors du processus enzymatique de la fibrinolyse. Ces nouvelles données viennent étayer l'intérêt de l'épicatéchine dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

Cite this: *Food Funct.*, 2019, **10**, 7291

Epicatechin influences primary hemostasis, coagulation and fibrinolysis

Thomas Sinegre,^a Dorian Teissandier,^a Dragan Milenkovic,^a Christine Morand^a and Aurélien Lebreton^{a,b}

The different stages of hemostasis (*i.e.*, primary hemostasis, coagulation and fibrinolysis) are involved in the early atherothrombosis steps. The aim of this study was to investigate the effect of epicatechin, a major flavonoid compound, on the hemostasis phenotype using clinically relevant *in vitro* global assays that mimic the complexity of the *in vivo* hemostasis systems. Plasma samples from 10 healthy volunteers were spiked with increasing concentrations of epicatechin (1 to 100 μM). Epicatechin effect on primary hemostasis, coagulation and fibrinolysis was assessed by measuring platelet aggregation using light transmission aggregometry, thrombin generation and clot lysis time (CLT), respectively. Epicatechin (100 μM) significantly decreased the maximal platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (–39%), thrombin receptor activating peptide (–48%), epinephrine (–30%), and collagen (–30%). The endogenous thrombin potential was significantly reduced starting from 1 μM epicatechin (1332 ± 230 versus 1548 ± 241 nM min for control) ($p < 0.01$). Fibrinolysis was promoted by epicatechin, as indicated by CLT decrease by 16 and 33% with 10 and 100 μM epicatechin respectively, compared with control (1271 ± 775 s). These findings show that epicatechin reduces platelet function and leads to an anticoagulant and pro-fibrinolytic profile, providing new evidence of its interest for cardiovascular disease prevention.

Received 19th April 2019,
Accepted 27th September 2019

DOI: 10.1039/c9fo00816k

rsc.li/food-function

(1) Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide and their incidence is strongly linked to dietary habits.^{1–4} The hemostatic system is a key determinant of the atheromatous plaque thrombogenicity, one of CVD outcomes and the main cause of death.⁵ Hemostasis is defined as the set of mechanisms that keeps blood fluid inside the vessels and prevents excessive bleeding after vessel injury. It also plays a key role in thrombogenicity.⁶ There are strong evidences that all the hemostasis steps (primary hemostasis, plasma coagulation and fibrinolysis) are implicated in atherothrombosis and in the thrombogenicity of atherosclerotic lesions and their complications, such as stroke and acute coronary syndrome.⁷

After a vascular injury, primary hemostasis starts quickly with the recruitment of platelets at the site of the vascular breach. After adhering to the damaged wall, platelets secrete their granule content, leading to their aggregation, and to the formation of a platelet plug. Platelets influence the progression of the atherosclerotic plaque by releasing adhesive ligands, fixing molecules from the plasma, and recruiting

monocytes and lymphocytes. Thus, platelets fixed on the vascular wall are involved in the development of atherosclerosis that precedes the onset of arterial thrombosis.^{8,9} Platelets are also involved in plasma coagulation *via* pro-coagulant molecules released from their granules and phospholipid exposure after platelet activation that support the successive coagulation enzymatic reactions. Coagulation generates a large amount of thrombin at the vascular injury site, leading to fibrin formation after fibrinogen cleavage, which is essential for clot formation.¹⁰ *In vivo*, coagulation is initiated by tissue factor (TF) that forms a complex with factor VIIa, leading to activation of factor X and IX. The generated thrombin then activates platelets and other coagulation factors, such as factor V, VIII and XI. These phenomena lead to the generation of a thrombin burst that catalyzes the formation of a critical mass of fibrin, which constitutes a stable clot. The activation of these pro-coagulant factors is counterbalanced and controlled by physiological anti-coagulants.¹¹ The coagulation cascade is involved in CVD, with a positive association between the risk of CVD and the circulating levels of coagulation factors, such as fibrinogen and factor VIII.¹² In addition to its crucial role in blood coagulation, thrombin belongs to the family of serine proteases and can activate protease-activated receptors present on endothelial cells, leading to an inflammatory response.^{13,14} Finally, fibrinolysis is the process leading to fibrin clot lysis to limit thrombus extension and to allow the vessel re-permeabilization. Plasmin, the

^aUniversité Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France. E-mail: tsinegre@chu-clermontferrand.fr; Fax: +334 73 750 215; Tél: +33 4 73 750 200

^bCHU Clermont-Ferrand, service d'hématologie biologique, Clermont-Ferrand, France

key protein in this step, is finely regulated by activators (tissue plasminogen activator, t-PA) and inhibitors (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1; thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI; and antiplasmin).¹⁵ Fibrinolysis assessment is based on the separate measurement of fibrinolysis activators and inhibitors, such as t-PA, PAI and D-dimers, or on the use of viscoelastic methods the utility of which is still debated.

A growing body of evidence highlighted the cardioprotective effects of dietary flavan-3-ols (epicatechin, catechin), a subclass of flavonoids abundant in cocoa-based food, grapes, red wine, tea, stone and pome fruits.^{16,17} Their protective effects include increase in endothelium-dependent vasodilation, reduction in systemic blood pressure, and attenuation of atherosclerosis, platelet activation, and thrombus formation.¹⁸ The beneficial effects of flavan-3-ol monomers on endothelial function have been well documented.¹⁶ However, their anti-platelet and antithrombotic effects are less characterized, especially their ability to modulate hemostasis. Consumption of epicatechin-rich foods induces positive changes in platelet function when assessed by measuring platelet aggregation, *ex vivo* bleeding time and platelet activation.¹⁹ Recently, it has also been suggested that epicatechin could interfere with molecules or cells involved in primary hemostasis, plasma coagulation and fibrinolysis.²⁰ The molecular mechanisms involved in the different stages of hemostasis are finely regulated with a constant balance between the action of physiological activators and inhibitors. However, this complexity cannot be properly addressed by simple assessment of the expression of genes or proteins involved in the modulation of these factors. Therefore, on the basis of the available published data it is impossible to determine the actual impact of epicatechin on hemostasis. To overcome this limitation, global assays designed to mimic the complexity of the *in vivo* hemostasis systems could be used. Global assays are innovative tools that take into account the majority of actors involved in a process, such as activators and inhibitors. They have the advantage to be closer to the *in vivo* hemostatic process, and consequently probably better correlated with clinical events. The present work evaluated the impact of epicatechin on primary hemostasis, coagulation and fibrinolysis using *in vitro* global hemostasis assays to determine the hemostatic phenotype in response to this bioactive food component.

(2) Materials and methods

Subjects

Ten healthy volunteers (5 women and 5 men; mean age 34 years [29–38]) without history of thromboembolism or bleeding disorders were enrolled in 2015. Exclusion criteria were ongoing therapy with antiplatelet (*e.g.*, aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs) or anticoagulant drugs, abnormal blood counts (including thrombocytopenia $<150 \text{ G L}^{-1}$), and coagulation abnormalities (fibrinogen $<2.0 \text{ g L}^{-1}$, prothrombin time [PT] >15.0 seconds, activated partial thromboplastin time [aPTT] >39 seconds).

All experiments were performed in accordance with the French laws and approved by the ethics committee of the university hospital of Clermont-Ferrand (Comité de Protection des Personnes Sud-Est VI, ref. AU765). Informed consents were obtained from all human participants of this study.

Blood sampling and plasma preparation

Blood was collected in the morning by venipuncture of an antecubital vein with a light tourniquet and a 21G needle in 0.109 M citrate tubes (Beckton Dickinson, le Pont de Claix, France) after discarding the first few milliliters. Platelet-rich plasma (PRP), required for light transmission aggregometry (LTA) and thrombin generation assay (TGA), was obtained by centrifugation at 200g at 20 °C for 10 min. For TGAs, platelet count in PRP samples was adjusted with autologous platelet-poor plasma (PPP) to a standardized count of 150 G L^{-1} (PRPa). For TGAs and clot lysis assays, PPP was obtained by centrifuging blood samples twice (2500g, 20 °C for 15 min) with an intermediate decantation, according to the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) guidelines.²¹ PRP samples were tested within 4 hours after blood sampling, whereas PPP samples were stored, if necessary, at -80 °C until testing (less than 1 month). Before the experiments, frozen plasma samples were thawed in a water bath at 37 °C for 5 min.

Epicatechin stock solution (12.5 mM in dimethyl sulfoxide, vehicle) was diluted with phosphate buffered saline to 100, 1000 and 10 000 μM working solutions that were then added to the plasma samples to reach the target concentrations (1, 10 and 100 μM) with a constant 1/100 dilution. An equivalent volume of vehicle was added to the baseline samples (0 ng ml^{-1}).

Light transmission aggregometry

LTA was performed using a photometric method on a TA-8v aggregometer (SD medical, Frouard, France). Briefly, 270 μL of each PRP sample was pre-incubated with epicatechin (or vehicle) at 37 °C for 10 minutes, and then mixed in specific glass tubes under continuous stirring with the following platelet agonists (final concentrations): 2 μM adenosine diphosphate (ADP), 5 μM epinephrine, 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ collagen, 1 mM arachidonic acid (Helena Laboratories, Beaumont, USA), or 10 μM thrombin receptor activating peptide (TRAP, Roche Rotkreuz, Switzerland). The agonist concentrations and methodology were standardized according to the ISTH guidelines.²² LTA was recorded for 6 minutes, and the area under the curve and the maximal aggregation were the main parameters used for this study.

Thrombin generation assay

TGA mimics the coagulation *in vivo* by evaluating its different steps: initiation, amplification, propagation and inhibition. TGA explores the overall thrombin potential by taking into account pro- and anti-coagulant factors. TGA results in the formation of a thrombogram that describes the thrombin generated over time. The main parameters are the endogenous thrombin potential (ETP), which represents the area under the

curve, thrombin peak, which corresponds to the maximum thrombin concentration, lag time, and time to peak. TGAs were performed using the Calibrated Automated Thrombogram method²³ with a fluorometer (Fluoroscan Ascent, ThermoLab Systems, Franklin, USA) equipped with a dispenser. Each sample was calibrated with Thrombin Calibrator® (Stago, Asnières, France). The impact of epicatechin on global coagulation was evaluated in PPP samples after the initiation of coagulation with 1 pM TF and 4 μM phospholipids (final concentrations, PPP reagent low®, Stago). Epicatechin effect on platelet pro-coagulant role was determined by TGA using PRP and PRPa samples with a final concentration of 1 pM TF without phospholipids (PRP reagent®, Stago). Samples were incubated with epicatechin at 37 °C for 10 minutes before adding the fluorogenic substrate and CaCl₂ (FluCa-Kit®, Thrombinoscope BV). All tests were performed in duplicate with a maximum difference <10% for ETP (nM min) between curves. Raw data were analyzed using Thrombinoscope™ V5 (Thrombinoscope BV). For each assay, ETP was the primary endpoint.

Clot lysis assays

To evaluate the fibrinolytic profile that results from the opposite action of pro-fibrinolytic molecules (*e.g.*, plasminogen, t-PA, or urokinase-type PA, u-PA) and inhibitors (PAI-1, PAI-2, antiplasmin and TAFI), fibrin clots were formed after coagulation activation and then lysed by addition of exogenous t-PA. Coagulation was initiated by addition of 1 pM TF in the presence of 4 μM coagulant phospholipids (PPP reagent) and 200 ng mL⁻¹ t-PA (final concentration) (t-PA, actilyse®, Boehringer, France). After stirring, absorbance was measured at 37 °C on a spectrophotometer at 405 nm (Synergy 2, Biotek, USA) every minute for 60 minutes. The clot lysis time (CLT) was defined as the time from the midpoint of the clear to maximum turbid transition, to the midpoint of the maximum turbid to clear transition. All tests were performed in duplicate with a maximal difference <10% for CLT between curves.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Prism software, version 6 (GraphPad software, Inc., La Jolla, USA). Tests were two-sided, with a type I error set at $\alpha = 0.05$. Continuous data were presented as the mean \pm standard deviation (SD). Independent groups were compared using ANOVA, or the Friedman test when the ANOVA conditions were not met (normality and homoscedasticity verified with the Bartlett test), followed by the appropriate multiple-comparison *post-hoc* tests (Tukey–Kramer or Dunn test, respectively).

(3) Results

Epicatechin effect on primary hemostasis

The effects of 1 to 100 μM epicatechin on the LTA parameters for a range of agonists used for the diagnosis of platelet function defects are presented in Table 1. In the presence of

Table 1 Epicatechin effect on primary hemostasis induced by agonists

	Vehicle	EC (1 μM)	EC (10 μM)	EC (100 μM)
(A) Maximum platelet aggregation				
ADP, 2 μM	70 \pm 15	61 \pm 22	61 \pm 25	43 \pm 22****
EPI, 5 μM	81 \pm 6	74 \pm 19	78 \pm 9	56 \pm 30**
COLL, 2 μg mL ⁻¹	80 \pm 5	78 \pm 13	75 \pm 11	56 \pm 29**
AA, 1 mM	84 \pm 10	80 \pm 4	86 \pm 7	80 \pm 9
TRAP, 10 μM	69 \pm 18	68 \pm 32	57 \pm 32	36 \pm 34*

Data are expressed as the mean percentage \pm SD

(B) Area under the curve of platelet aggregation

ADP, 2 μM	189 \pm 43	166 \pm 61	164 \pm 77	106 \pm 60****
EPI, 5 μM	147 \pm 32	133 \pm 47	136 \pm 44	88 \pm 40***
COLL, 2 μg mL ⁻¹	164 \pm 15	159 \pm 32	158 \pm 27	104 \pm 58***
AA, 1 mM	213 \pm 22	204 \pm 19	220 \pm 28	186 \pm 49
TRAP, 10 μM	178 \pm 71	192 \pm 108	156 \pm 109	94 \pm 108*

Data are expressed as the mean value (% min) \pm SD. Light transmission aggregometry in PRP samples ($N = 10$); **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ compared with vehicle (ANOVA or Friedman test when the ANOVA conditions were not met, followed by the appropriate multiple-comparison *post-hoc* tests). ADP: adenosine diphosphate; EC: epicatechin; EPI: epinephrine; COLL: collagen; AA: arachidonic acid; PRP: platelet-rich plasma; TRAP: thrombin receptor activating peptide.

100 μM epicatechin, the maximum platelet aggregation was reduced with all agonists, except arachidonic acid (Table 1A). Epicatechin effect was highest in the presence of 2 μM ADP and 10 μM TRAP (maximum platelet aggregation reduction by 39% and 48%, respectively, compared with vehicle), and moderated with 5 μM epinephrine and 2 μg mL⁻¹ collagen (reduction by 30%; $p < 0.01$). Similar results were obtained when the area under curve was calculated (Table 1B), with a significant decrease by 43% and 47% for ADP- and TRAP-induced platelet aggregation, respectively. Analysis of ADP-induced platelet aggregation kinetics clearly showed the significant inhibitory effect of 100 μM epicatechin (Fig. 1). Importantly, platelet aggregation was reversible. Taken together, these data suggested that epicatechin influences the

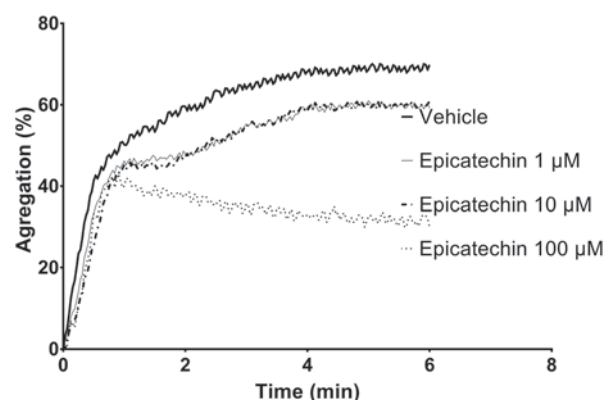


Fig. 1 Epicatechin effect on ADP-induced platelet aggregation kinetics light transmission aggregometry in platelet-rich plasma samples for 6 minutes after platelet aggregation induction by addition of 2 μM ADP. Plots represent the average points ($N = 10$).

Table 2 Epicatechin effect on platelet pro-coagulant role

	Vehicle	EC (1 μM)	EC (10 μM)	EC (100 μM)
Lag time (min)	5.8 \pm 1.3	5.8 \pm 1.3	6.1 \pm 1.5	5.9 \pm 1.4
ETP (nM min)	1290 \pm 220	1294 \pm 248	1318 \pm 248	1188 \pm 276 * $^{\circ}$
Peak (nM)	104 \pm 54	103 \pm 50	107 \pm 57	97 \pm 58
Time to peak (min)	14.1 \pm 4	14.1 \pm 4	14.4 \pm 4.4	14.1 \pm 4.3

Thrombin generation assays performed using PRPa samples ($N = 10$). Values are the mean \pm SD. * $p < 0.05$ compared with vehicle, $^{\circ} p < 0.05$ compared with 1 μM epicatechin, $^{\circ} p < 0.05$ compared with 10 μM epicatechin (ANOVA or Friedman test, when the ANOVA conditions were not met, followed by the appropriate multiple-comparison *post-hoc* tests). EC: epicatechin; ETP: endogenous thrombin potential; PRPa: adjusted platelet-rich plasma.

intra-platelet signaling pathways, leading to a reduced pro-aggregation response.

Epicatechin effect on the platelet pro-coagulant role

When TGAs were performed after incubation of PRPa samples with 100 μM epicatechin, ETP (nM min) decreased significantly from 1290 \pm 220 (vehicle) to 1188 \pm 276, whereas no significant change was observed with the other tested concentrations (Table 2 and Fig. 2A). Similar ETP values and thrombin generation curves were obtained when non-adjusted PRP samples were used (data not shown), suggesting that epicatechin inhibited platelet pro-coagulant action independently of platelet count.

Effect of epicatechin on global plasma coagulation

Epicatechin effect on plasma coagulation was assessed by TGA using PPP samples pre-incubated with epicatechin (Table 3). ETP decreased from 1548 \pm 241 with vehicle to 1332 \pm 230 ($p < 0.01$), 1280 \pm 321 ($p < 0.01$) and 1369 \pm 292 ($p < 0.01$) upon incubation with 1, 10 and 100 μM epicatechin, respectively. Thrombin peak also significantly decreased by 11% after incubation with 1, 10 or 100 μM epicatechin. Thrombin activation kinetic was affected starting from 1 μM epicatechin (Fig. 2B) and this slow-down was confirmed by the increased lag time (min), from 5.5 \pm 1.3 for vehicle to 6.6 \pm 2.3 ($p < 0.05$) and 7.6 \pm 4.4 ($p < 0.01$) with 1 and 10 μM epicatechin respectively (Table 3). Time to reach the thrombin peak was also significantly increased by addition of epicatechin, with a shift from 7.7 \pm 1.2 (vehicle) to 10.0 \pm 4.4 ($p < 0.001$) with 10 μM epicatechin (Table 3). These data demonstrated that epicatechin, when used in the range of 1 to 10 μM , can inhibit and delay the enzymatic reactions involved in the coagulation process.

Epicatechin effect on global fibrinolysis

Epicatechin effect on fibrinolysis was assessed by using a clot lysis assay (Table 4). When assays were performed with 200 ng mL^{-1} of t-PA to initiate fibrinolysis, in the presence of TF and phospholipids, PPP incubation with epicatechin led to a dose-dependent CLT decrease, and consequently higher sensitivity to t-PA (Fig. 3). Specifically, compared with vehicle, CLT

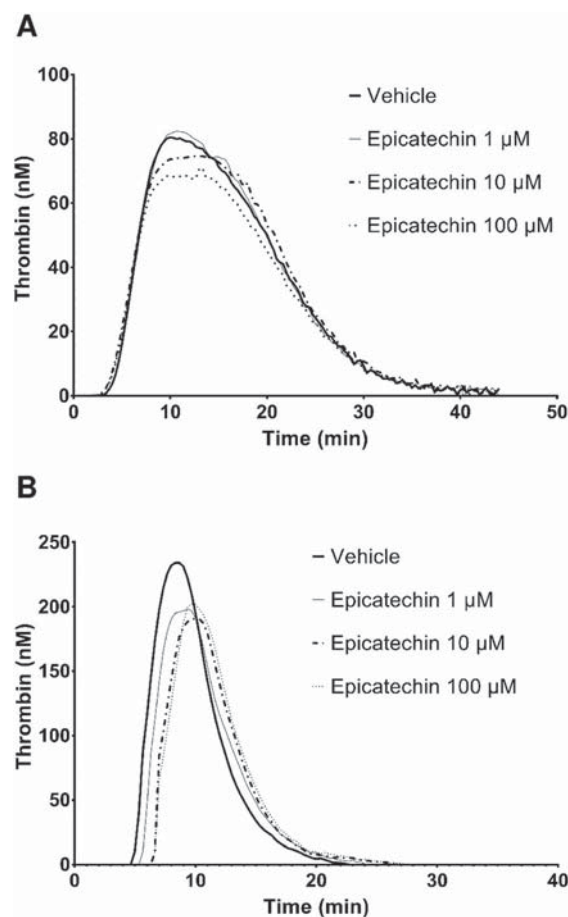


Fig. 2 Epicatechin effect on thrombin generation kinetics. (A) Thrombin generation was triggered in adjusted platelet-rich plasma (PRPa) by addition of 1 pM exogenous tissue factor and phospholipids derived from the patient's platelets, as support for enzymatic coagulation reactions. (B) Thrombin generation was performed in platelet-poor plasma (PPP) samples with 1 pM tissue factor and 4 μM pro-coagulant phospholipids. Plots represent the average points ($N = 10$).

Table 3 Epicatechin effect on global coagulation

	Vehicle	EC (1 μM)	EC (10 μM)	EC (100 μM)
Lag time (min)	5.5 \pm 1.3	6.6 \pm 2.3*	7.6 \pm 4.4***	7.5 \pm 4.1**
ETP (nM min)	1548 \pm 241	1332 \pm 230**	1280 \pm 321**	1369 \pm 292**
Peak (nM)	342 \pm 68	297 \pm 75**	291 \pm 84**	301 \pm 87*
Time to peak (min)	7.7 \pm 1.2	9.0 \pm 2.4	10.0 \pm 4.4***	9.8 \pm 4.2**

Thrombin generation assays performed using PPP samples ($N = 10$). Values are the mean \pm SD. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with vehicle (ANOVA or Friedman test, when the ANOVA conditions were not met, followed by the appropriate multiple-comparison *post-hoc* tests). EC: epicatechin; ETP: endogenous thrombin potential; PPP: platelet-poor plasma.

gradually decreased by 8% (NS), 16% ($p < 0.05$) and 33% ($p < 0.001$) with 1 μM , 10 μM and 100 μM epicatechin, respectively. These data indicated that epicatechin improved the fibrin clot sensitivity to lysis.

Table 4 Epicatechin effect on clot lysis time

	Vehicle	EC (1 μM)	EC (10 μM)	EC (100 μM)
Half lysis time (s)	1271 \pm 775	1173 \pm 720	1069 \pm 639*	848 \pm 476***

Experiments performed using PPP samples ($N = 10$) with t-PA (200 ng mL^{-1}). Values are the mean \pm SD. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ compared with vehicle (Friedman test followed by the multiple-comparison *post-hoc* Dunn test). EC: epicatechin; PPP: platelet-poor plasma; t-PA: tissue plasminogen activator.

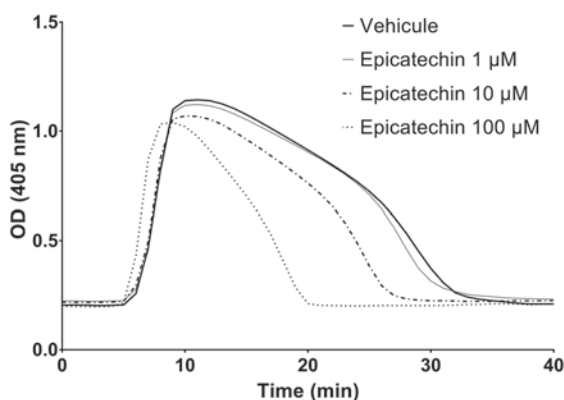


Fig. 3 Epicatechin effect on clot generation and lysis over time platelet-poor plasma (PPP) samples were incubated with increasing concentrations of epicatechin. Fibrin clot was formed after activation with 1 pM tissue factor and lysis initiated with 200 ng mL^{-1} t-PA. Plots represent the average points ($N = 10$).

(4) Discussion

The present study investigated the bioefficacy of epicatechin on hemostasis by using global assays for the assessment of primary hemostasis, plasma coagulation and fibrinolysis. Our findings show that epicatechin influences all hemostasis steps, leading to decreased platelet aggregation and pro-coagulant activity and increased fibrinolytic activity.

Diets and foods rich in flavonoids (berries, grapes, cocoa, green tea) can modulate platelet function.²⁴ Specifically, it has been shown that these bioactive compounds inhibit platelet aggregation induced by agonists, such as collagen, ADP, thrombin, thromboxane A2 analog and arachidonic acid,^{25–30} and modulate the expression of surface molecules, such as platelet membrane receptor glycoprotein IIb/IIIa and P-selectin.^{27,30–33} They also extend platelet closure time in response to ADP and epinephrine.^{34–36} Despite the diversity of the techniques used, consistent findings suggest that plant foods with high flavon-3-ols content can modulate primary hemostasis.²⁴ However, the specific role of these compounds remains to be established. Few previous studies have attempted to evaluate the impact of pure epicatechin on platelet functions; however, the experimental conditions varied between studies (epicatechin concentrations, number and concentrations of the tested agonists). Epicatechin (100 μM) con-

sistently inhibits platelet aggregation induced by collagen,³⁷ but not aggregation induced by 2.4 nM thrombin (150 and 1000 μM epicatechin).³⁸ Neiva *et al.* showed *in vitro* inhibition of platelet aggregation using PRP samples incubated with 170 μM and 700 μM epicatechin and ADP, arachidonic acid or epinephrine.³⁹ These epicatechin concentrations were higher than those tested in our study. Indeed, using LTA that is considered as the gold standard for evaluating platelet function,²² we observed a trend towards a reduction of primary hemostasis from 1 μM epicatechin and a significant effect at 100 μM epicatechin. The different responses to agonists among studies, including ours, may be explained by methodological differences. For example, previous studies used PRPa samples.^{38,39} As this practice is no longer recommended by ISTH,²² in the present study we used unadjusted PRP samples for LTA. Indeed, the PPP used for PRP dilution may contain substances, such as ADP, that may desensitize platelets and interfere with the test results.⁴⁰

Our data showed a major decrease of platelet aggregation induced by ADP and TRAP, a moderate decrease for collagen, and no decrease for arachidonic acid. The inhibition of platelet aggregation and the abnormal reversible profile we observed with epicatechin suggest a poor amplification of the cellular response and the absence of intra-platelet granule release. Among the different ADP receptors, the Gi-coupled P2Y12 receptor plays a central role in the amplification of platelet aggregation induced by other agonists, and participates in platelet granule secretion. This receptor is a key factor for promoting clot growth and stabilization, and is also the pharmacological target of antiplatelet agents, such as prasugrel.⁴¹ Therefore, the aggregation defects we observed in the presence of epicatechin could be explained by an interference with P2Y12 signaling, or by a lower secretion of dense intra-platelet granules.⁴² Additional details on changes in the intra-platelet signaling pathways induced by epicatechin could be obtained by improving the test sensitivity, especially with the use of washed platelets, and by studying the content and secretion of dense granules.

Coagulation is characterized by the successive activation of serine proteases, leading to thrombin release at the site of vascular injury. This process is finely regulated by inhibitors to downregulate thrombin generation. The conventional methods used to explore plasma coagulation, including factor measurement or routine coagulation assays, such as PT and aPTT, have severe limitations. They do not consider all the factors involved, particularly anticoagulant factors, and they take into account only the first thrombin traces, and not the propagation phase that leads to the thrombin burst.⁴³ Thus, these tests, which do not replicate the *in vivo* pathophysiology, did not seem appropriate to evaluate the overall impact of epicatechin on the complex coagulation cascade. Moreover, previous studies reported only a low impact of epicatechin on PT and aPTT.^{39,44} Global coagulation assays, such as TGA, are closer to the *in vivo* situation by taking into account all coagulation factors, including inhibitors.⁴⁵ Therefore, here we used TGAs to determine epicatechin effect on global coagulation. The

data we obtained using PPP samples clearly show that already 1 μM epicatechin slowed down thrombin generation and significantly reduced ETP. The weaker epicatechin effect observed when using PRP samples suggests an epicatechin inhibitory effect mainly on the enzymatic reactions of the coagulation cascade that lead to thrombin generation. Moreover, epicatechin effect could be counteracted also by its potential interaction with platelet phospholipids and proteins. TGA with PPP is more specific for enzymatic interactions, while TGA with PRP integrates the platelet phospholipid component for coagulation, which did not seem to be affected by epicatechin in our study.⁴⁶

This result could question the potential of epicatechin to affect thrombin activity. A previous study reported weak interactions between epicatechin and thrombin that could inhibit thrombin amidolytic activity.³⁸ Additional studies, such as 3D *in silico* docking analyses, are required to determine whether epicatechin interacts with Histidine 57 in thrombin catalytic pocket and interferes with its activity, as previously suggested for some flavonoid compounds.⁴⁷ Conversely, our TGA results indicate an epicatechin inhibitory effect on the whole coagulation process, including inhibitory pathways. Epicatechin impact on the thrombin modulatory effects on the protein C pathway and fibrin formation deserves further mechanistic investigations.

The dynamic interactions of pro- and anti-fibrinolytic molecules tightly control the fibrinolytic process *in vivo*. To precisely assess this balance, it is crucial to use a global technique. Clot lysis assays, which measure the plasma fibrinolytic potential using TF-induced clots lysed by exogenous t-PA, is a suitable tool for the analysis of the complex interactions between pro- and anti-fibrinolytic molecules.⁴⁸ Using this assay, we showed that epicatechin enhances fibrinolysis with a trend observed at 1 μM and reaching significance from 10 μM epicatechin. Fibrinolysis seemed to be activated earlier and occurred faster when plasma samples were incubated with epicatechin, even at low concentrations. This result completes and strengthens previous studies showing that incubation of endothelial cells with 10 μM epicatechin increased transcription of the t-PA and u-PA encoding genes,⁴⁹ and incubation with tea flavan3-ols decreased PAI-1 activity.⁵⁰

In the present study, the use of global coagulation assays allowed us to highlight epicatechin beneficial impact on the hemostatic phenotype, although the mechanistic aspects remain to be accurately investigated. However, this study was performed with pure epicatechin only, whereas human bioavailability studies showed that the main circulating forms of epicatechin are conjugated derivatives.⁵¹ The beneficial effects of epicatechin *in vivo* are potentially related to the bioactivity of these metabolites. Their impact on hemostasis at physiologically relevant concentrations should be explored specifically in new studies. Moreover, the effect of epicatechin, particularly on platelet aggregation, is also partially related to its anti-oxidant effect that might be reduced after epicatechin is metabolized.⁵² However, as these metabolites are not currently available, an *ex vivo* approach that would take into account epicatechin metabolism after intake deserves to be studied.

In conclusion, this study has provided the first evidences that epicatechin can positively affect all the stages of hemostasis, leading to decreased platelet activity, anticoagulant effect and pro-fibrinolytic activity. Taken together, these data strengthen the interest of epicatechin for CVD prevention by reducing the atherosclerotic plaque thrombogenicity. *In vivo* studies are now needed to confirm the benefit on hemostasis of a long-term epicatechin supplementation.

Author contributions

AL, CM, TS designed the study. TS performed the assays and statistical analysis. TS, CM, AL wrote the manuscript. DT and DM critically reviewed the article.

Funding sources

This study was supported by a grant from Octapharma.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

Authors sincerely thank the staff of INRA UNH of Theix, the technical staff of the hemostasis department (University hospital of Clermont-Ferrand) and Elisabetta Andermarcher for American English editing.

References

- 1 G. A. Roth, M. D. Huffman, A. E. Moran, V. Feigin, G. A. Mensah, M. Naghavi and C. J. L. Murray, Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013, *Circulation*, 2015, **132**, 1667–1678.
- 2 GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013, *Lancet*, 2015, **385**, 117–171.
- 3 D. Mozaffarian, E. J. Benjamin, A. S. Go, D. K. Arnett, M. J. Blaha, M. Cushman, S. R. Das, S. de Ferranti, J.-P. Després, H. J. Fullerton, V. J. Howard, M. D. Huffman, C. R. Isasi, M. C. Jiménez, S. E. Judd, B. M. Kissela, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, S. Liu, R. H. Mackey, D. J. Magid, D. K. McGuire, E. R. Mohler, C. S. Moy, P. Muntner, M. E. Mussolino, K. Nasir, R. W. Neumar, G. Nichol, L. Palaniappan, D. K. Pandey, M. J. Reeves, C. J. Rodriguez, W. Rosamond, P. D. Sorlie, J. Stein, A. Towfighi, T. N. Turan, S. S. Virani, D. Woo, R. W. Yeh and M. B. Turner, Heart Disease and Stroke

- Statistics—2016 Update: A Report From the American Heart Association, *Circulation*, 2016, **133**, e38–e360.
- 4 M. Nichols, N. Townsend, P. Scarborough and M. Rayner, Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update, *Eur. Heart J.*, 2013, **34**, 3028–3034.
 - 5 A. D. Blann and G. Y. H. Lip, Venous thromboembolism, *Br. Med. J.*, 2006, **332**, 215–219.
 - 6 V. Fuster, P. R. Moreno, Z. A. Fayad, R. Corti and J. J. Badimon, Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2005, **46**, 937–954.
 - 7 R. Ajjan and P. J. Grant, Coagulation and atherothrombotic disease, *Atherosclerosis*, 2006, **186**, 240–259.
 - 8 Z. M. Ruggeri, Platelets in atherothrombosis, *Nat. Med.*, 2002, **8**, 1227–1234.
 - 9 W. Koenig, Haemostatic risk factors for cardiovascular diseases, *Eur. Heart J.*, 1998, **19 Suppl C**, C39–C43.
 - 10 M. Hoffman and D. M. Monroe, A cell-based model of hemostasis, *Thromb. Haemostasis*, 2001, **85**, 958–965.
 - 11 S. A. Smith, The cell-based model of coagulation, *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 2009, **19**, 3–10.
 - 12 G. Lowe and A. Rumley, The relevance of coagulation in cardiovascular disease: what do the biomarkers tell us?, *Thromb. Haemostasis*, 2014, **112**, 860–867.
 - 13 H. ten Cate and G. Lowe, Coagulation proteases and cardiovascular disease, *Thromb. Haemostasis*, 2014, **112**, 858–859.
 - 14 H. Ten Cate, T. M. Hackeng and P. García de Frutos, Coagulation factor and protease pathways in thrombosis and cardiovascular disease, *Thromb. Haemostasis*, 2017, **117**, 1265–1271.
 - 15 G. Cesarman-Maus and K. A. Hajjar, Molecular mechanisms of fibrinolysis, *Br. J. Haematol.*, 2005, **129**, 307–321.
 - 16 D. Mozaffarian and J. H. Y. Wu, Flavonoids, Dairy Foods, and Cardiovascular and Metabolic Health: A Review of Emerging Biologic Pathways, *Circ. Res.*, 2018, **122**, 369–384.
 - 17 J. I. Ottaviani, C. Heiss, J. P. E. Spencer, M. Kelm and H. Schroeter, Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: Revisited, *Mol. Aspects Med.*, 2018, **61**, 63–75.
 - 18 D. R. Mangels and E. R. Mohler, Catechins as Potential Mediators of Cardiovascular Health, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2017, **37**, 757–763.
 - 19 L. M. Ostertag, P. A. Kroon, S. Wood, G. W. Horgan, E. Cienfuegos-Jovellanos, S. Saha, G. G. Duthie and B. de Roos, Flavan-3-ol-enriched dark chocolate and white chocolate improve acute measures of platelet function in a gender-specific way—a randomized-controlled human intervention trial, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2013, **57**, 191–202.
 - 20 M. Bijak, J. Saluk, R. Szelenberger and P. Nowak, Popular naturally occurring antioxidants as potential anticoagulant drugs, *Chem.-Biol. Interact.*, 2016, **257**, 35–45.
 - 21 Subcommittee on Control of Anticoagulation of the SSC of the ISTH, Towards a recommendation for the standardization of the measurement of platelet-dependent thrombin generation, *J. Thromb. Haemostasis*, 2011, **9**, 1859–1861.
 - 22 M. Cattaneo, C. Cerletti, P. Harrison, C. P. M. Hayward, D. Kenny, D. Nugent, P. Nurden, A. K. Rao, A. H. Schmaier, S. P. Watson, F. Lussana, M. T. Pugliano and A. D. Michelson, Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH, *J. Thromb. Haemostasis*, 2013, **11**, 1183–1189.
 - 23 H. C. Hemker, P. Giesen, R. Aldieri, V. Regnault, E. de Smed, R. Wagenvoort, T. Lecompte and S. Béguin, The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability, *Pathophysiol. Haemostasis Thromb.*, 2002, **32**, 249–253.
 - 24 B. J. McEwen, The influence of diet and nutrients on platelet function, *Semin. Thromb. Hemostasis*, 2014, **40**, 214–226.
 - 25 M. Bijak, J. Saluk, M. B. Ponczek and P. Nowak, Antithrombin effect of polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds, *Phytother. Res.*, 2013, **27**, 71–76.
 - 26 A. J. Innes, G. Kennedy, M. McLaren, A. J. Bancroft and J. J. F. Belch, Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers, *Platelets*, 2003, **14**, 325–327.
 - 27 W. S. Kang, K. H. Chung, J. H. Chung, J. Y. Lee, J. B. Park, Y. H. Zhang, H. S. Yoo and Y. P. Yun, Antiplatelet activity of green tea catechins is mediated by inhibition of cytoplasmic calcium increase, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2001, **38**, 875–884.
 - 28 J. G. Keevil, H. E. Osman, J. D. Reed and J. D. Folts, Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation, *J. Nutr.*, 2000, **130**, 53–56.
 - 29 K. J. Murphy, A. K. Chronopoulos, I. Singh, M. A. Francis, H. Moriarty, M. J. Pike, A. H. Turner, N. J. Mann and A. J. Sinclair, Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, **77**, 1466–1473.
 - 30 B. Olas, B. Wachowicz, A. Stochmal and W. Oleszek, The polyphenol-rich extract from grape seeds inhibits platelet signaling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists, *Platelets*, 2012, **23**, 282–289.
 - 31 I. Krga, N. Vidovic, D. Milenkovic, A. Konic-Ristic, F. Stojanovic, C. Morand and M. Glibetic, Effects of anthocyanins and their gut metabolites on adenosine diphosphate-induced platelet activation and their aggregation with monocytes and neutrophils, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2018, **645**, 34–41.
 - 32 B. Olas, M. Kedzierska, B. Wachowicz, A. Stochmal and W. Oleszek, Effects of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* on the markers of oxidative stress and blood platelet activation, *Platelets*, 2010, **21**, 274–281.
 - 33 D. Rein, T. G. Paglieroni, T. Wun, D. A. Pearson, H. H. Schmitz, R. Gosselin and C. L. Keen, Cocoa inhibits platelet activation and function, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, **72**, 30–35.
 - 34 I. Erlund, R. Koli, G. Alfthan, J. Marniemi, P. Puukka, P. Mustonen, P. Mattila and A. Jula, Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, **87**, 323–331.
 - 35 R. R. Holt, D. D. Schramm, C. L. Keen, S. A. Lazarus and H. H. Schmitz, Chocolate consumption and platelet function, *J. Am. Med. Assoc.*, 2002, **287**, 2212–2213.

- 36 D. A. Pearson, T. G. Paglieroni, D. Rein, T. Wun, D. D. Schramm, J. F. Wang, R. R. Holt, R. Gosselin, H. H. Schmitz and C. L. Keen, The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function, *Thromb. Res.*, 2002, **106**, 191–197.
- 37 S. Heptinstall, J. May, S. Fox, C. Kwik-Urbe and L. Zhao, Cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: recent in vitro and ex vivo studies in healthy adults, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2006, **47**(Suppl 2), S197–S205; discussion S206–S209.
- 38 M. Bijak, R. Ziewiecki, J. Saluk, M. Ponczek, I. Pawlaczyk, H. Krotkiewski, B. Wachowicz and P. Nowak, Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds, *Med. Chem. Res.*, 2014, **23**, 2324–2337.
- 39 T. J. Neiva, L. Morais, M. Polack, C. M. Simões and E. A. D'Amico, Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation, *Phytother. Res.*, 1999, **13**, 597–600.
- 40 M. Cattaneo, A. Lecchi, M. L. Zighetti and F. Lussana, Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count, *Haematologica*, 2007, **92**, 694–697.
- 41 I. Algaier, J. A. Jakubowski, F. Asai and I. von Kügelgen, Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y₁₂ receptor, *J. Thromb. Haemostasis*, 2008, **6**, 1908–1914.
- 42 C. Gachet, P2 receptors, platelet function and pharmacological implications, *Thromb. Haemostasis*, 2008, **99**, 466–472.
- 43 K. G. Mann, K. Brummel and S. Butenas, What is all that thrombin for?, *J. Thromb. Haemostasis*, 2003, **1**, 1504–1514.
- 44 L. Liu, H. Ma, N. Yang, Y. Tang, J. Guo, W. Tao and J. Duan, A Series of Natural Flavonoids as Thrombin Inhibitors: Structure-activity relationships, *Thromb. Res.*, 2010, **126**, e365–e378.
- 45 H. C. Hemker and S. Béguin, Phenotyping the clotting system, *Thromb. Haemostasis*, 2000, **84**, 747–751.
- 46 H. C. Hemker, P. Giensen, R. Al Dieri, V. Regnault, E. de Smed, R. Wagenvoort, T. Lecompte and S. Béguin, The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability, *Pathophysiol. Haemostasis Thromb.*, 2002, **32**, 249–253.
- 47 M. Mozzicafreddo, M. Cuccioloni, A. M. Eleuteri, E. Fioretti and M. Angeletti, Flavonoids inhibit the amidolytic activity of human thrombin, *Biochimie*, 2006, **88**, 1297–1306.
- 48 C. Longstaff, Measuring fibrinolysis: from research to routine diagnostic assays, *J. Thromb. Haemostasis*, 2018, **16**, 652–662.
- 49 L. H. Abou-Agag, M. L. Aikens, E. M. Tabengwa, R. L. Benza, S. R. Shows, H. E. Grenett and F. M. Booyse, Polyphenolics increase t-PA and u-PA gene transcription in cultured human endothelial cells, *Alcohol: Clin. Exp. Res.*, 2001, **25**, 155–162.
- 50 J. Liu, C. Ying, Y. Meng, W. Yi, Z. Fan, X. Zuo, C. Tian and X. Sun, Green tea polyphenols inhibit plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in endothelial cells, *Blood Coagulation Fibrinolysis*, 2009, **20**, 552–557.
- 51 J. I. Ottaviani, G. Borges, T. Y. Momma, J. P. E. Spencer, C. L. Keen, A. Crozier and H. Schroeter, The metabolome of [2-(14)C](–)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 29034.
- 52 P. Pignatelli, S. Di Santo, B. Buchetti, V. Sanguigni, A. Brunelli and F. Violi, Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment, *FASEB J.*, 2006, **20**, 1082–1089.

Publication n°2

« Impact of Epicatechin on the Procoagulant Activities of Microparticles »

**T. Sinigre, D. Milenkovic, C. Bourgne, D. Teissandier, Y. Nasri, LT.
Dannus, C. Morand, A. Lebreton**

Nutrients, 2020 Sep 25;12(10):2935.

doi: 10.3390/nu12102935.

Résumé

Le rôle des microparticules dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires est une problématique d'intérêt grandissant. L'épicatéchine, appartenant aux flavan-3-ols, est de plus en plus étudiée en raison de ses effets bénéfiques pour la santé cardiovasculaire. L'objectif de cette étude était de déterminer l'impact de l'épicatéchine sur la formation et la libération de microparticules ainsi que sur leur phénotype et leurs propriétés procoagulantes.

Des échantillons de plasma provenant de 15 sujets sains ont été incubés avec des concentrations croissantes d'épicatéchine (1 à 100 μ M). L'expression de la glycoprotéine IIb, de la phosphatidylsérine, de la glycoprotéine Ib et de la sélectine P a été évaluée par analyse en cytométrie en flux avant et après stimulation plaquettaire par le peptide activateur du récepteur de la thrombine ou le calcium ionophore. L'activité procoagulante des microparticules et l'impact de l'épicatéchine sur cette activité a été déterminée de plusieurs manières. Les kits Zymuphen™ MP et Zymuphen™ MP-TF ont permis respectivement d'intégrer la composition en phospholipides procoagulants et le rôle activateur de l'expression du facteur tissulaire. Le test de génération de thrombine a été modifié pour évaluer la fonction procoagulante des microparticules, ces dernières étant la seule source de phospholipides et de facteur tissulaire.

Les concentrations en microparticules d'origine plaquettaire détectées par la présence de la glycoprotéine IIb ne semblent pas impactées par l'épicatéchine et

l'on observe une forte variabilité interindividuelle du taux de microparticules. Celles exprimant conjointement la glycoprotéine GPIb (μL) ont diminué de 20743 ± 24985 (véhicule) à 14939 ± 14333 ($p = 0,6$), 21366 ± 16949 ($p = 0,9$) et 15425 ± 9953 ($p < 0,05$) dans les échantillons incubés avec 1, 10 et 100 μM d'épicatéchine, respectivement. Mesurée avec le kit ZymuphenTM MP la concentration en microparticules (exprimée en nM équivalent phosphatidylsérine) a diminué significativement par rapport au contrôle ($5,6 \pm 2,0$, véhicule) après incubation avec 10 et 100 μM d'épicatéchine pour atteindre $4,5 \pm 1,5$ ($p < 0,05$) et $4,7 \pm 2,0$ ($p < 0,05$) respectivement. Mais l'épicatéchine n'a eu aucun impact sur la concentration de microparticules positives pour le facteur tissulaire. L'épicatéchine a diminué le potentiel endogène de thrombine exprimé en nM.min de 586 ± 302 à 509 ± 226 ($p = 0,3$), 512 ± 270 ($p = 0,3$) et 445 ± 283 ($p < 0,05$).

Ces résultats indiquent que l'épicatéchine peut affecter les microparticules d'origine plaquettaire, essentiellement avant stimulation par des agonistes, et leurs propriétés procoagulantes.

Article

Impact of Epicatechin on the Procoagulant Activities of Microparticles

Thomas Sinegre ^{1,2,*}, Dragan Milenkovic ¹, Céline Bourgne ², Dorian Teissandier ¹,
Yosra Nasri ², Louis-Thomas Dannus ², Christine Morand ¹ and Aurélien Lebreton ^{1,2}

¹ UNH Unité de Nutrition Humaine, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Université Clermont Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France; dragan.milenkovic@inra.fr (D.M.); dteissandier@chu-clermontferrand.fr (D.T.); christine.morand@inrae.fr (C.M.); alebreton@chu-clermontferrand.fr (A.L.)

² CHU Clermont-Ferrand, Service d'Hématologie Biologique, 63000 Clermont-Ferrand, France; cbourgne@chu-clermontferrand.fr (C.B.); ynasri@chu-clermontferrand.fr (Y.N.); ltdannus@chu-clermontferrand.fr (L.-T.D.)

* Correspondence: tsinegre@chu-clermontferrand.fr

Received: 6 August 2020; Accepted: 23 September 2020; Published: 25 September 2020



Abstract: Microparticles play a role in cardiovascular disease pathology. The flavanol-like epicatechin is increasingly considered due to its cardioprotective effects. The aim of this study was to investigate the impact of epicatechin on microparticle generation, phenotype and procoagulant properties. Plasma samples from 15 healthy subjects were incubated with increasing concentrations of epicatechin (1 to 100 μ M). Then, the expression of glycoprotein IIb, phosphatidylserine (PS), glycoprotein Ib (GPIb) and P-selectin was assessed by flow cytometry analysis after (or not) platelet stimulation. Microparticle procoagulant activity was determined using ZymuphenTM MP and ZymuphenTM MP-TF for phospholipid and tissue factor content, and with thrombin generation (TG) assays for procoagulant function. Platelet microparticles that express GPIb (μ L) decreased from 20,743 \pm 24,985 (vehicle) to 14,939 \pm 14,333 ($p = 0.6$), 21,366 \pm 16,949 ($p = 0.9$) and 15,425 \pm 9953 ($p < 0.05$) in samples incubated with 1, 10 and 100 μ M epicatechin, respectively. Microparticle concentration (nM PS) decreased from 5.6 \pm 2.0 (vehicle) to 5.1 \pm 2.2 ($p = 0.5$), 4.5 \pm 1.5 ($p < 0.05$) and 4.7 \pm 2.0 ($p < 0.05$) in samples incubated with 1, 10 and 100 μ M epicatechin, respectively. Epicatechin had no impact on tissue factor-positive microparticle concentration. Epicatechin decreased TG (endogenous thrombin potential, nM.min) from 586 \pm 302 to 509 \pm 226 ($p = 0.3$), 512 \pm 270 ($p = 0.3$) and 445 \pm 283 ($p < 0.05$). These findings indicate that epicatechin affects microparticle release, phenotype and procoagulant properties.

Keywords: cardiovascular disease; coagulation; epicatechin; hemostasis; microparticles

1. Introduction

Microparticles are small, anucleate vesicles ranging from 100 to 1000 nm in size. They are released by many cell types, including platelets, monocytes, red and endothelial cells by exocytosis from the cell membranes upon cell activation, stress or apoptosis [1]. Microparticles are delimited by a phospholipid bilayer and express proteins from the cell of origin [2]. Microparticles are detected in healthy subjects, and their release increases in various pathological conditions, such as cancer, diabetes, sepsis and cardiovascular diseases (CVD) [3–5].

Platelet microparticles (PMPs) represent the main fraction of circulating microparticles and are formed upon platelet activation, glycoprotein (Gp) IIb-IIIa signaling or after exposure to shear stress [6,7]. PMPs express Gp IIb-IIIa (CD41) and Gp Ib (CD42b), phospholipids (e.g., phosphatidylserine (PS)

and phosphatidylcholine) and activation markers, such as P-selectin (CD62P) [8]. There are growing evidences for PMP physiological and pathological roles. For instance, PMP can interfere in cell-to-cell communication through various mechanisms, from the direct stimulation of target receptors to integration of surface receptors in a target cell. PMPs can also transfer their cytoplasmic content, including RNA [9], and modulate the adaptive immunity by stimulating the immune response [10]. PMPs also play a major role in pathological processes, such as infections, mainly through the transfer of receptors to recipient cells to allow virus entry, and in systemic diseases, such as rheumatoid arthritis, by amplification of the local inflammatory response [11]. PMPs also play a role in cancer development by favoring angiogenesis and tumor cell invasion, and can be predictive markers of metastasis formation and tumor aggressiveness [12–14]. Due to their high procoagulant activity, PMPs are a prognostic marker of choice in CVD [15,16]. Indeed, PMP concentration is increased following myocardial damage after acute myocardial infarction [17], particularly PMP sub-populations that express specific markers, such as P-selectin [18]. Large PMPs are associated with specific conditions, such as carotid atherosclerosis [19] and myocardial infarction, and also with the circulation of the thrombin-antithrombin complex and soluble CD40 ligand [20], the increase of which correlates with higher risk of cardiovascular events [21]. PMPs seem to play a key role in CVD due to the expression of phospholipids and procoagulant surface markers, and their capacity to recruit leukocytes, to transfer miRNAs and to promote inflammation [22–24].

Several studies demonstrated that a diet rich in polyphenols is inversely associated with CVD risk and mortality [25–27]. It has also been suggested that polyphenols influence the functions of platelets, one of the major players in the atherothrombotic process. Different polyphenols and especially flavonoids can modulate platelet activation and aggregation [28–30]. Epicatechin is a major representative of the flavanol subclass of flavonoids due to its abundance in highly consumed plant foods, such as cocoa, apples, tea and grapes [31,32]. A wealth of data from preclinical models and clinical trials indicates that epicatechin has cardioprotective effects by improving endothelial and platelet functions, reducing blood pressure and limiting atherosclerosis [33,34]. It has been reported that different polyphenols and plant food extracts can affect PMP formation [35–38]; however, to our knowledge, there is no study on the specific impact of epicatechin on PMPs. The aim of this study was to investigate in vitro epicatechin effect on PMP generation, phenotype and procoagulant properties by incubating human plasma with increasing concentrations of epicatechin.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

Fifteen healthy volunteers, 12 women and 3 men (mean age 30 years (21–42)) were enrolled. Exclusion criteria were history of bleeding and thromboembolism, ongoing antiplatelet drug or anticoagulant therapy and abnormal blood cell count, including thrombocytopenia <150 G/L and coagulation disorders fibrinogen <2.0 or >4.0 g/L, prothrombin time >15.5 s and activated partial thromboplastin time >39 s. Ethical approval was obtained from the local ethics committee (CPP Sud-Est VI, ref AU765).

2.2. Blood Sampling and Processing

Blood was collected by venipuncture in 0.109 M citrate tubes (Beckton Dickinson, le Pont de Claix, France) with 15 µg/mL of corn trypsin inhibitor to inhibit contact factor activation and after discarding the first few milliliters of blood. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 200 g at room temperature for 10 min, without brake. Platelet-poor plasma (PPP) was prepared by double centrifugation (2200 g, 20 °C for 15 min) with an intermediate plasma decantation, according to the International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH) guidelines [39]. PPP samples were stored at –80 °C until testing (less than 3 months), if necessary. Before the experiments, frozen plasma samples were thawed in a water bath at 37 °C for 5 min. Microparticle-rich plasma (MRP) was obtained

from PPP centrifugation at 14,000 g at room temperature for 1 h. The microparticle-containing pellet was resuspended in 100 μ L of the supernatant after centrifugation (and thus microparticle-poor) to concentrate microparticles by 5.0-fold.

(-)-Epicatechin stock solution (Extrasynthèse, Lyon, France; 12.5 mM in DMSO) was diluted with phosphate buffered saline (PBS) to 0.1, 1 and 10 mM working solutions that were then added to the plasma samples to reach the target final concentrations of 1, 10 and 100 μ M with a constant 1/100 dilution. An equivalent volume of vehicle was added to samples without epicatechin. Plasma samples were incubated with epicatechin at 37 °C for 10 min.

Cytometry Analysis of Microparticles

All cytometry analyses were performed with fresh samples. The impact of epicatechin on microparticles was determined in three conditions (all samples were pre-incubated with epicatechin): after incubation of PRP samples with PBS, to assess the direct role of epicatechin on microparticle production and their phospholipid and protein membrane composition (condition 1); after PRP incubation with platelet activators to simulate microparticle production (calcium ionophore A23187 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA)) (condition 2) and with thrombin receptor activating peptide (TRAP; Roche, Mannheim, Germany) (condition 3), and to study epicatechin role in microparticle production and composition (Figure A1). Afterwards, samples were incubated with FITC-conjugated annexin-V (PS labeling), anti-CD41a-PE (glycoprotein IIb, clone HIP8), anti-CD42b-APC (glycoprotein Ib, clone HIP1) and anti-CD62P-BV421 (P-selectin, clone AK-4) antibodies (all from BD Biosciences) at room temperature in the dark for 20 min. Isotype controls (at the same concentration as the primary antibodies) were used as negative controls to differentiate non-specific background and specific antibody signals. Immediately after labeling, samples were resuspended in 250 μ L of 0.20 μ m-filtered annexin-V buffer and were analyzed on a BD FACS Canto II (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), equipped with three lasers (407, 488 and 633 nm wavelengths) and the BDFACS Diva software (v.8.0.1).

Flow cytometer performance tracking was performed daily using the BD cytometer setup and tracking beads (BD Biosciences). To ensure a limited background noise, filtered PBS (0.20 μ m filter) was analyzed before each run at least for 10 min.

For each analysis, 100 μ L of fresh PPP diluted at 1/100 or 1/200 was transferred to a TruCount tube (BD Biosciences) containing a lyophilized pellet that releases a known number of fluorescent beads to allow microparticle quantification.

Before each series of sample analysis, fluorescent Megamix-Plus SSC Beads (Biocytex, Marseille, France), a mix of fluorescent beads ranging from 0.1 to 1 μ m, were used to define the gate consistent with the microparticle size, according to the manufacturer's instructions. The Megamix-Plus by its standardized acquisition defines microparticles between 0.17 and 0.5 μ m equivalent-SSC and allows discriminating between small and large microparticles (i.e., smaller and bigger than 0.22 μ m-eq SSC). PMPs were characterized on the basis of the side scatter threshold defined using Megamix-Plus SSC Beads and labeling with CD41a, a constitutive platelet receptor.

2.3. Phospholipid-Induced Procoagulant Activity of Microparticles

Microparticle procoagulant activity was determined using ZymuphenTM MP-ACTIVITY (Hyphen-biomed, Neuville, France), a functional immunological assay, according to the manufacturer's protocol. Briefly, after pre-incubation with epicatechin, 5 μ L of each PPP sample was incubated in a well of a microplate coated with annexin V that can bind to electronegative phospholipids at the microparticle surface. In the presence of calcium, factors (F) Xa and FVa, prothrombin are activated into thrombin in relation with microparticle exposure to phospholipids. Thrombin activity was measured by absorbance at 405 nm on a spectrophotometer (Spark, Tecan, Switzerland) following cleavage of a specific substrate. Plasma microparticle concentration was expressed in nM of PS equivalent.

2.4. Tissue factor (TF)-Induced Procoagulant Activity of Microparticles

Microparticle procoagulant activity was determined using ZymuphenTM MP-TF (Hyphen-biomed), a functional immunological assay, according to the manufacturer's protocol. Briefly, after pre-incubation with epicatechin, 20 μ L of PPP was incubated in wells coated with an anti-TF monoclonal antibody. In the presence of calcium, FVIIa and FX, TF-positive microparticles form the TF-FVIIa complex and activate FX into FXa. TF-induced microparticle procoagulant activity was correlated with FXa activity on a specific substrate measured by absorbance at 405 nm on a spectrophotometer (Tecan) and was expressed in pg/mL.

2.5. Thrombin Generation Assays

Thrombin generation assays (TGA) were used in two experimental conditions to measure epicatechin effect on microparticle procoagulant activity by following the thrombin formation kinetics. First, MRP samples were incubated with increasing concentrations of epicatechin, as before, to evaluate the anticoagulant impact of epicatechin. Second, PRP samples were incubated with epicatechin before platelet stimulation by addition of 20 μ M of the calcium ionophore A23187 (Sigma-Aldrich) that promotes platelet activation and apoptosis [40]. Then, MRPs were prepared as described above, and TGA were performed to evaluate the impact of epicatechin on the release of procoagulant microparticles from platelets.

TGA were performed using a modified Calibrated Automated Thrombogram method developed by Hemker [41], with a fluorometer (Fluoroscan Ascent, ThermoLab Systems, Franklin, TN, USA) equipped with a dispenser. Briefly, in 96-well plates (Immulon 2HB, Waltham, MA, USA), 30 μ L of MRP samples was used as the source of phospholipids and TF. Then, 70 μ L of a pool of normal plasma from 10 healthy donors, 20 μ L of fluorogenic substrate and CaCl₂ (FluCa-Kit[®], Thrombinoscope BV) were added to the wells. In parallel, each sample was calibrated with Thrombin Calibrator[®] (Stago, Asnières, France) and the same pool of normal plasma. The main parameter was the endogenous thrombin potential (ETP, area under the curve). All tests were performed in duplicate with a maximum difference <10% for ETP (nM.min) between curves. Raw data were analyzed using ThrombinoscopeTM V5 (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands).

2.6. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with the Prism software, version 6 (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA). Tests were two-sided, with a type I error set at $\alpha = 0.05$. Continuous data were presented as the mean \pm standard deviation (SD). The statistical significance of differences between classes was determined with ANOVA, or the Friedman test when the ANOVA conditions were not met (normality and homoscedasticity verified with the Bartlett test), followed by the appropriate multiple comparison post-hoc tests (Tukey–Kramer or Dunn test, respectively).

3. Results

3.1. PMP Phenotype by Flow Cytometry

Pre-incubation with epicatechin did not have any effect on PMP concentration (PMP/ μ L) in PRP samples incubated with PBS (64,153 \pm 45,388 for samples incubated with vehicle and 68,726 \pm 41,966, 77,864 \pm 49,161 and 59,841 \pm 29,101 for samples incubated with 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M of epicatechin, respectively), with the calcium ionophore (537,613 \pm 481,651 PMP/ μ L for samples incubated with vehicle and 683,474 \pm 469,130, 551,204 \pm 349,680 and 578,943 \pm 375,997 for samples incubated with 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M of epicatechin, respectively) and with TRAP (100,870 \pm 97,521 PMP/ μ L for samples incubated with vehicle and 117,215 \pm 68,917, 101,101 \pm 46,059 and 111,693 \pm 76,321 for samples incubated with 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M of epicatechin, respectively). The concentrations of the two PMP populations (small and large) were not modified by pre-incubation with epicatechin, in all tested

conditions. Of note, the inter-individual variability of PMP concentration was high, as indicated by the coefficient of variation of 70%.

On the other hand, epicatechin influenced the expression of CD62P at the PMP surface. When PRP was incubated with PBS, the percentage of CD62P-positive PMP decreased from 20.5 ± 13.7 in samples incubated with vehicle to 15.1 ± 10.4 ($p < 0.05$), 18.6 ± 11.5 ($p = 0.34$) and 15.3 ± 9.3 ($p < 0.05$) in samples incubated with 1 μM , 10 μM and 100 μM of epicatechin, respectively. The percentage of small and large CD62P-positive PMP also was modified: 13.4 ± 10.5 versus 7.8 ± 9.3 ($p < 0.05$), 9.3 ± 8.6 ($p = 0.17$), 7.4 ± 6.7 ($p < 0.05$) for small PMP, and 21.4 ± 14.3 versus 16.1 ± 9.5 ($p < 0.05$), 19.6 ± 12.3 ($p = 0.16$), 16.6 ± 9.7 ($p < 0.05$) for large PMP in samples incubated with vehicle versus 1 μM , 10 μM and 100 μM epicatechin, respectively. When PRP samples were incubated with the calcium ionophore or TRAP, the percentage of CD62P-positive PMP remained stable (31.4 ± 17.2 to 34.4 ± 11.9 , and 13.0 ± 9.6 to 13.4 ± 9.5 for samples pre-incubated with vehicle and 100 μM epicatechin followed by calcium ionophore and TRAP, respectively), without any impact on the two sub-populations (small and large).

Epicatechin did not have any effect on the expression of PS (bound to annexin V), a driving force of the coagulation propagation phase. PS-positive PMP concentration (per μL) remained stable after incubation of PRP samples with PBS ($51,136 \pm 32,617$ for samples incubated with vehicle and $57,889 \pm 33,060$, $64,977 \pm 42,499$ and $49,983 \pm 25,245$ for samples incubated with 1 μM , 10 μM and 100 μM epicatechin, respectively), with the calcium ionophore ($471,828 \pm 317,764$ for samples incubated with vehicle and $571,121 \pm 367,628$ for samples incubated with 100 μM epicatechin) and with TRAP ($84,045 \pm 89,370$ for samples incubated with vehicle and $81,023 \pm 42,741$ for samples incubated with 100 μM epicatechin). After incubation with the calcium ionophore and TRAP, PS-positive PMP concentration remained stable also in the two sub-populations.

Epicatechin influenced the expression of CD42b (glycoprotein Ib) that participates in the coagulation process. After incubation with PBS, CD42b-positive PMP concentration (PMP/ μL) decreased from 20743 ± 24985 in samples incubated with vehicle to $14,939 \pm 14,333$ ($p = 0.6$), $21,366 \pm 16,949$ ($p = 0.9$) and $15,425 \pm 9953$ ($p < 0.05$) in samples incubated with 1 μM , 10 μM and 100 μM epicatechin, respectively (Figure 1A). This decrease was mainly explained by the reduction in the concentration of CD42b-positive PMPs in the small subpopulation, from 1350 ± 1234 (in samples incubated with vehicle) to 783 ± 488 ($p < 0.05$) (in samples incubated with 100 μM epicatechin) (Figure 1B), while the large CD42b-positive PMP subpopulation remained stable.

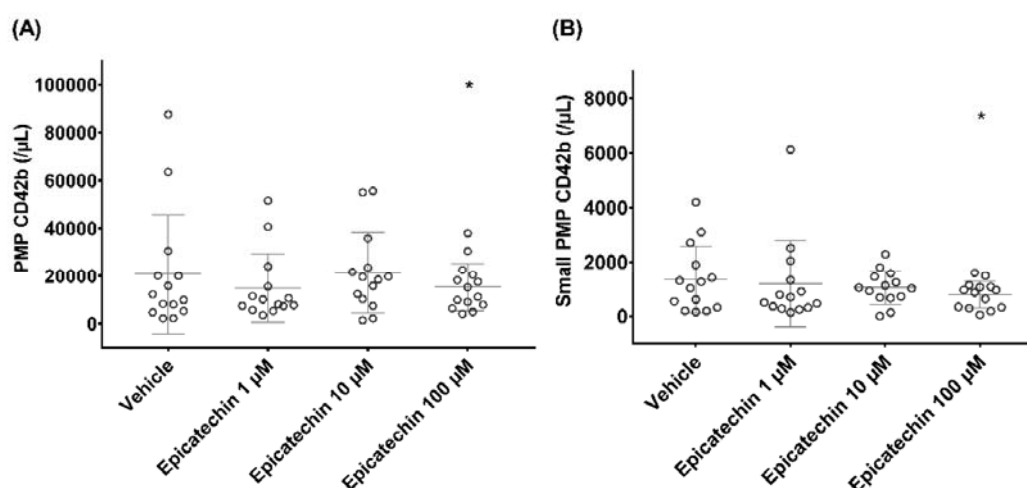


Figure 1. Impact of epicatechin on the concentration of platelet microparticles (PMPs) that express glycoprotein Ib. (A) Total PMP population. (B) Small PMP subpopulation. * Significant effect of intensity.

After incubation with the calcium ionophore or TRAP, the concentration of CD42b-positive PMPs was comparable in samples pre-incubated with vehicle and epicatechin. The changes in CD42b-positive PMP levels in the small subpopulation were associated with a decrease in the median

CD42b fluorescence signal from 85 ± 77 in samples incubated with vehicle to 45 ± 50 ($p < 0.01$), 61 ± 40 ($p < 0.5$) and 46 ± 45 ($p < 0.5$) in samples incubated with $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$ epicatechin, respectively (Figure 2).

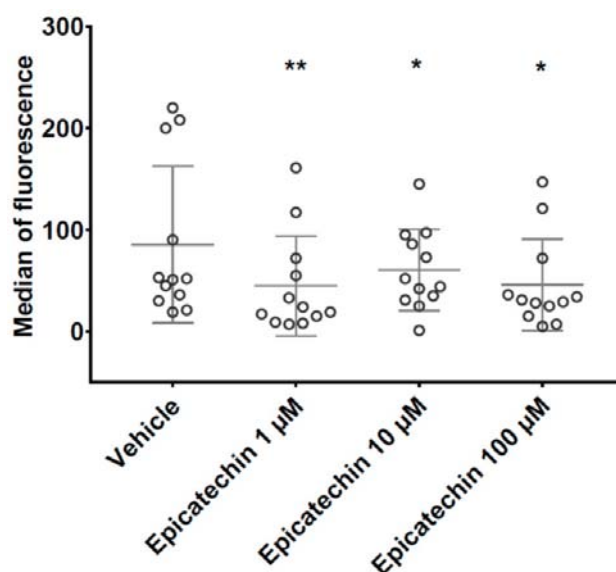


Figure 2. Impact of epicatechin on glycoprotein Ib expression at the surface of small PMPs. *, ** Significant effect of intensity.

In all experimental conditions, incubation with epicatechin induced an imbalance in the small to large PMP ratio (%). After incubation with PBS, this ratio decreased from 9.4 ± 5.6 in samples incubated with vehicle to 8.3 ± 5.3 ($p = 0.9$), 6.8 ± 5.1 ($p < 0.01$) and 6.4 ± 4.5 ($p < 0.05$) in samples incubated with $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$ epicatechin, respectively. After incubation with the calcium ionophore, this ratio decreased from 31.9 ± 15.6 in samples incubated with vehicle to 25.7 ± 14.8 ($p < 0.01$), 26.9 ± 16.1 ($p < 0.05$) and 24.9 ± 10.8 ($p < 0.05$) in samples incubated with $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$ epicatechin, respectively. After PRP incubation with TRAP, the ratio dropped from 20.3 ± 32.8 in samples incubated with vehicle to 11.0 ± 8.2 , 8.7 ± 8.2 and 6.4 ± 4.8 ($p < 0.05$) in samples incubated with $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$ epicatechin, respectively.

3.2. Epicatechin Effect on Microparticle-Induced Coagulation

Epicatechin influenced microparticle concentration when their procoagulant activity in response to phospholipids was assessed using the ZymuphenTM MP activity kit. PS-positive microparticle concentration (nM PS) decreased from 5.6 ± 2.0 in samples incubated with vehicle to 5.1 ± 2.2 ($p = 0.5$), 4.5 ± 1.5 ($p < 0.05$) and 4.7 ± 2.0 ($p < 0.05$) in samples incubated with 1, 10 and $100 \mu\text{M}$ epicatechin, respectively (Figure 3A).

No impact of epicatechin on TF-positive microparticle concentration (pg/mL) was observed when the procoagulant activity was induced by TF and assessed using the ZymuphenTM MP-TF kit: 2.0 ± 0.8 in samples incubated with vehicle, and 2.0 ± 0.9 ($p = 0.9$), 1.8 ± 0.8 ($p = 0.9$) and 1.9 ± 0.8 ($p = 0.9$) in samples incubated with 1, 10 and $100 \mu\text{M}$ epicatechin, respectively (Figure 3B).

Epicatechin influenced TGA performed with MRP as source of phospholipids and TF. ETP (nM.min) decreased from 586 ± 302 in samples incubated with vehicle to 509 ± 226 ($p = 0.3$), 512 ± 270 ($p = 0.3$) and 445 ± 283 ($p < 0.05$) in samples incubated with 1, 10 and $100 \mu\text{M}$ epicatechin, respectively (Figure 4A). Thrombin peak (nM) also decreased from 9 ± 6 in samples incubated with vehicle to 7 ± 5 ($p = 0.2$), 7 ± 5 ($p = 0.4$) and 6 ± 5 ($p < 0.05$) in samples incubated with 1, 10 or $100 \mu\text{M}$ epicatechin, respectively (Figure 4B). Thrombin activation kinetics tended to change, but not significantly. Specifically, lag time

and time to peak ranged from 40.2 ± 19.5 and 69 ± 32 in samples incubated with vehicle to 53.1 ± 25.2 and 88 ± 38 in samples incubated with $100 \mu\text{M}$ epicatechin, respectively.

In calcium-stimulated PRP, ETP decreased from 779 ± 246 in samples incubated with vehicle to 739 ± 243 ($p < 0.05$), 774 ± 257 ($p = 0.4$) and 708 ± 268 ($p < 0.001$) in samples incubated with 1, 10 and $100 \mu\text{M}$ epicatechin, respectively (Figure 5A). Thrombin peak also decreased from 65 ± 34 in samples incubated with vehicle to 60 ± 33 ($p < 0.05$), 68 ± 33 ($p = 0.6$) and 64 ± 41 ($p < 0.05$) in samples incubated with 1, 10 and $100 \mu\text{M}$ epicatechin, respectively (Figure 5B). Thrombin activation kinetics were similar in all experimental conditions, with a lag time of about 15 min and a time to peak of about 22 min.

These data showed that $100 \mu\text{M}$ epicatechin can inhibit microparticle-mediated coagulation without affecting the lag time of thrombin generation.

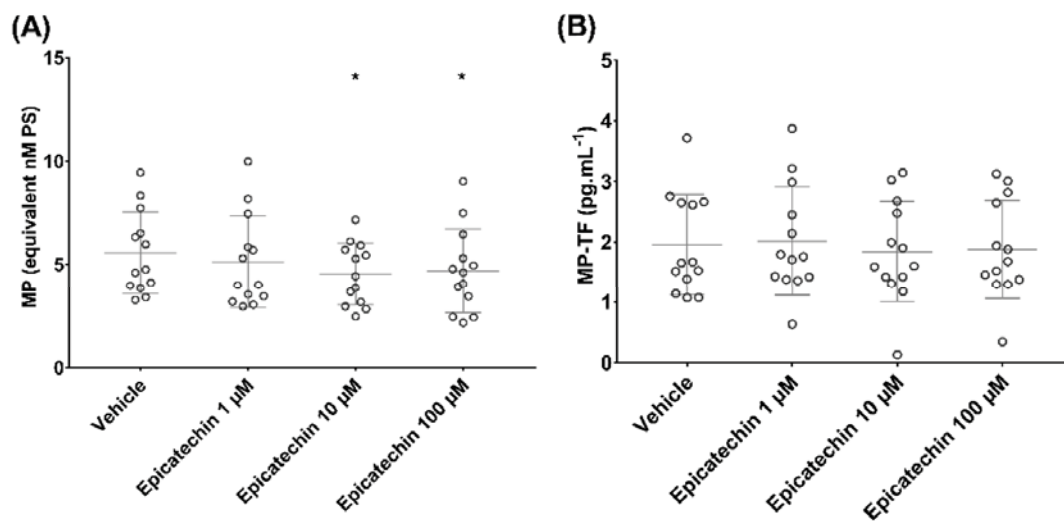


Figure 3. Effect of epicatechin on the concentration of microparticles (MPs) that express (A) phosphatidylserine (PS) and (B) tissue factor (TF). * Significant effect of intensity.

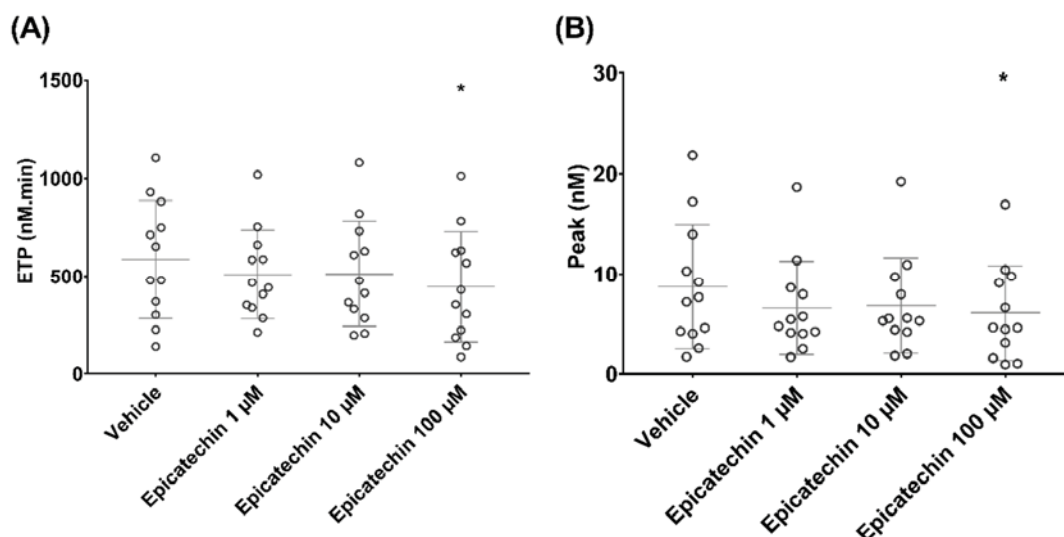


Figure 4. Effect of epicatechin on thrombin generation in microparticle-rich plasma. (A) Endogenous thrombin potential (ETP). (B) Thrombin peak. * Significant effect of intensity.

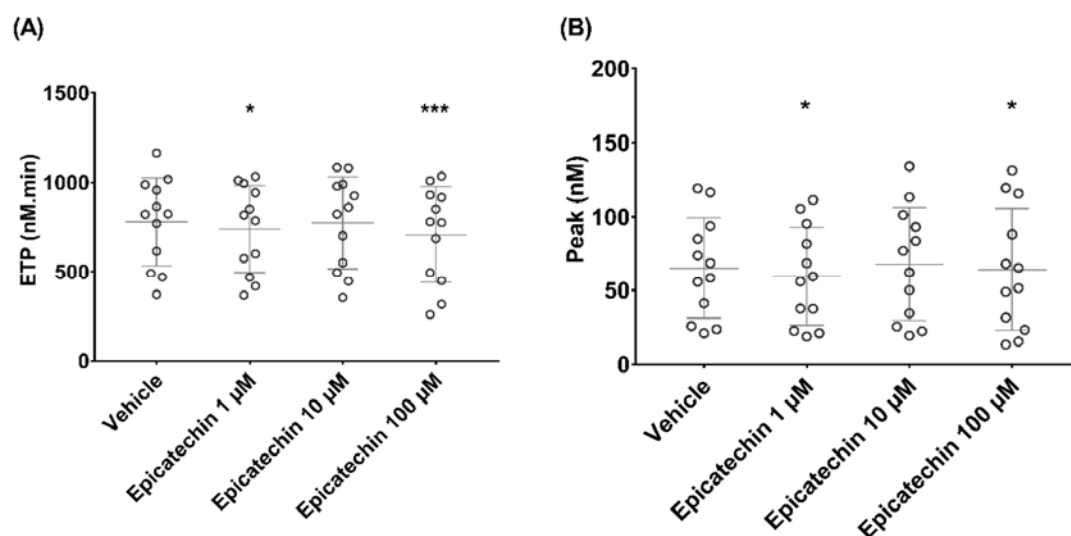


Figure 5. Effect of epicatechin on thrombin generation in microparticle-rich plasma after microparticle release stimulation by incubation with the calcium ionophore. (A) Endogenous thrombin potential (ETP). (B) Thrombin peak. *, *** Significant effect of intensity.

4. Discussion

There is strong evidence of the antiplatelet effects of dietary polyphenols, and it is suggested that polyphenols may have an impact on microparticles [42]. The present study investigated epicatechin role in microparticle formation and procoagulant potential that plays a key role in CVD (Figure 6) [43,44].

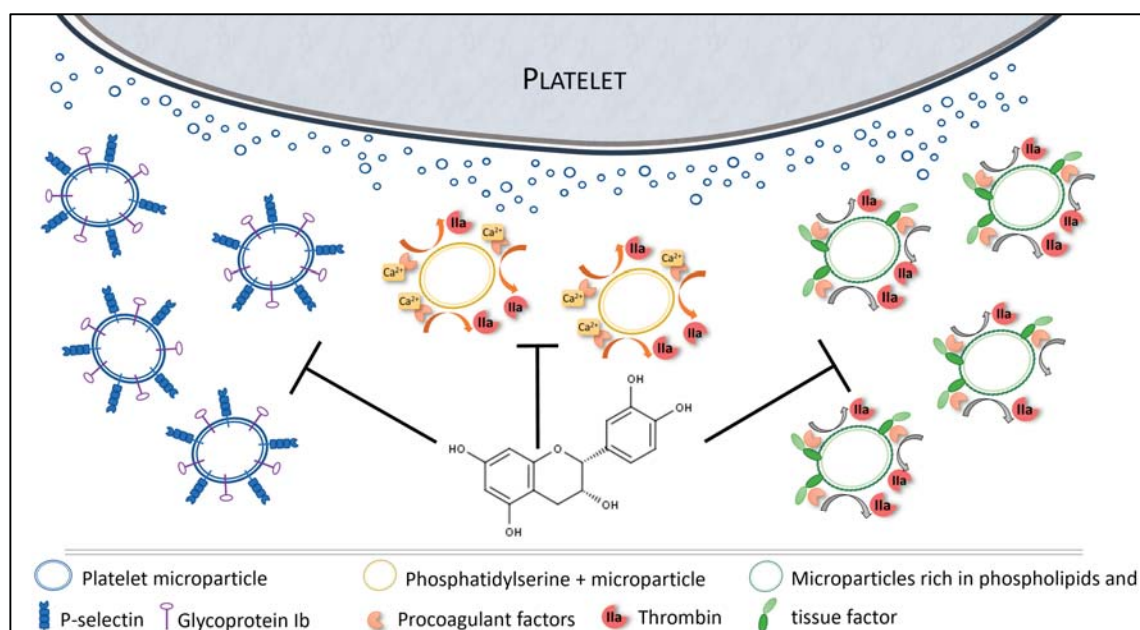


Figure 6. Overview of the impacts of epicatechin on microparticles.

Our findings show that overall, epicatechin does not influence the concentration of PMPs, which were identified by labeling with the constitutive platelet receptor CD41a, even after platelet activation by agonists, such as TRAP or a calcium ionophore. However, some PMP sub-populations seem to be affected by epicatechin. Indeed, the percentage of total (small and large) P-selectin-expressing PMPs decreased, while PS expression was unchanged. The expression of GpIb at the PMP surface, particularly in small PMPs, was reduced already by incubation with 1 μM of epicatechin. Epicatechin

also generated an imbalance between large and small GpIb-positive PMPs, following stimulation with the calcium ionophore, by increasing the large microparticle fraction.

There is evidence that microparticles smaller than 0.5 μm have specific properties, such as inhibition of the collagen/adenosine-diphosphate-mediated formation of platelet thrombi [45]. The epicatechin-induced decrease in GpIb-positive microparticles could impair their reactivity to thrombin and von Willebrand factor [46], and might have a direct impact on myocardial infarction pathogenesis [47]. Furthermore, epicatechin effect from 1 μM on P-selectin-expressing PMPs could have a beneficial effect on the risk of major adverse cardiovascular events after myocardial infarction [48,49], probably because of P-selectin role in thrombosis and in the recruitment of leukocytes in inflammation [50,51].

Microparticles are procoagulant factors due to their membrane that supports the coagulation enzymatic cascade. This property is reinforced by anionic phospholipids (e.g., PS) and TF, the main coagulation activator [52]. Here, we observed a functional impact of epicatechin on microparticle procoagulant role. Specifically, incubation with epicatechin reduced their phospholipid-mediated procoagulant activity (from 10 μM of epicatechin), but not the activity mediated by TF. Interestingly, TGA, which uses microparticles as phospholipid source and TF to trigger coagulation, is decreased by epicatechin. These data seem to demonstrate that epicatechin can inhibit microparticle-mediated coagulation by affecting the number and phenotype of the released microparticles, and/or the enzymatic reaction of coagulation.

Several studies have shown that initiation of thrombin generation is mainly supported by microparticles derived from monocytes, and not by PMPs [53,54]. However, PMPs contribute to clot propagation and to prothrombotic activities after initiation [55]. Surprisingly, we found that PS-expressing PMPs were not modified by epicatechin. It was previously reported that epicatechin can inhibit thrombin activity [56,57]. This could explain the effect on the procoagulant activity mediated by phospholipids and on thrombin generation, and the absence of effect on the procoagulant action mediated by TF. Taken together, these data support epicatechin interest in CVD through its action on microparticles (PMP generation and size/properties) and on thrombin generation. Its capacity to modulate microparticles could contribute to its health protective effects [58].

This study has some limitations. Ottaviani et al. showed that among the stereoisomers of flavan-3-ol, (-)-epicatechin is the one with the highest bioavailability [59]. It would also be interesting to explore the effect of long-term *in vivo* exposure to lower concentrations of epicatechin, instead of short *in vitro* exposure to higher concentrations [60]. *In vivo*, epicatechin is present in the plasma as conjugated derivatives, resulting from phase II metabolism occurring after its intestinal absorption [61]. More studies are needed to thoroughly assess the bioactivity of epicatechin metabolites at physiologically relevant concentrations that we could not perform because they are not available yet. This is an *in vitro* study that must be completed by mechanistic investigations.

In conclusion, we demonstrated that epicatechin positively affects microparticle generation, phenotype and procoagulant properties, particularly PMPs. Given microparticle importance in CVD and the major complications of CVD, these data open new perspectives on how epicatechin can affect coagulation that deserve to be confirmed in *in vivo* studies.

Author Contributions: Conceptualization, T.S. and A.L.; methodology, T.S., C.B., L.-T.D. and Y.N.; validation, C.M. and A.L.; writing—original draft preparation, T.S., A.L., C.B. and C.M.; writing—review and editing, T.S., A.L., C.M., D.T., C.B. and D.M.; funding acquisition, A.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by a grant from Octapharma.

Acknowledgments: Authors sincerely thank the staff of INRA UNH of Theix, the technical staff of the hemostasis department (University hospital of Clermont-Ferrand) and Elisabetta Andermarcher for American English editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funder had no role in the study.

Appendix A

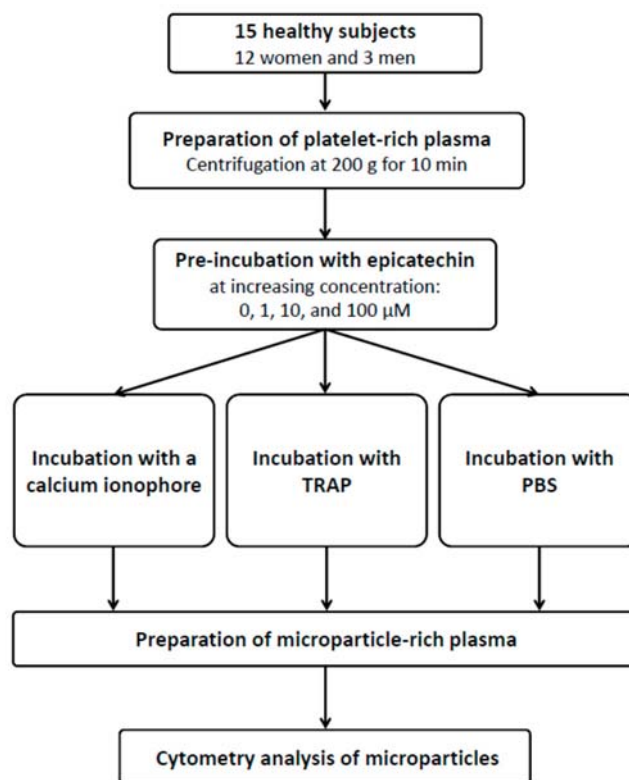


Figure A1. Study flow diagram describing the cytometry analysis of microparticles. TRAP: thrombin receptor activating peptide; PBS: phosphate buffered saline.

References

1. Varon, D.; Shai, E. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. *J. Thromb. Haemost.* **2015**, *13* (Suppl. 1), S40–S46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. El-Gamal, H.; Parra, A.S.; Mir, F.A.; Shuaib, A.; Agouni, A. Circulating microparticles as biomarkers of stroke: A focus on the value of endothelial- and platelet-derived microparticles. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 16739–16754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lovren, F.; Verma, S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin. Chem.* **2013**, *59*, 1166–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pardo, F.; Villalobos-Labra, R.; Sobrevia, B.; Toledo, F.; Sobrevia, L. Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. *Mol. Aspects Med.* **2018**, *60*, 81–91. [[CrossRef](#)]
5. Raeven, P.; Zipperle, J.; Drechsler, S. Extracellular Vesicles as Markers and Mediators in Sepsis. *Theranostics* **2018**, *8*, 3348–3365. [[CrossRef](#)]
6. Hargett, L.A.; Bauer, N.N. On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication. *Pulm. Circ.* **2013**, *3*, 329–340. [[CrossRef](#)]
7. Zaldivia, M.T.K.; McFadyen, J.D.; Lim, B.; Wang, X.; Peter, K. Platelet-Derived Microvesicles in Cardiovascular Diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* **2017**, *4*, 74. [[CrossRef](#)]
8. Diamant, M.; Tushuizen, M.E.; Sturk, A.; Nieuwland, R. Cellular microparticles: New players in the field of vascular disease? *Eur. J. Clin. Investig.* **2004**, *34*, 392–401. [[CrossRef](#)]
9. Ratajczak, J.; Wysoczynski, M.; Hayek, F.; Janowska-Wieczorek, A.; Ratajczak, M.Z. Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* **2006**, *20*, 1487–1495. [[CrossRef](#)]

10. Sprague, D.L.; Elzey, B.D.; Crist, S.A.; Waldschmidt, T.J.; Jensen, R.J.; Ratliff, T.L. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: Unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* **2008**, *111*, 5028–5036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Italiano, J.E.; Mairuhu, A.T.A.; Flaumenhaft, R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr. Opin. Hematol.* **2010**, *17*, 578–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Dovizio, M.; Bruno, A.; Contursi, A.; Grande, R.; Patrignani, P. Platelets and extracellular vesicles in cancer: Diagnostic and therapeutic implications. *Cancer Metastasis Rev.* **2018**, *37*, 455–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Haemmerle, M.; Stone, R.L.; Menter, D.G.; Afshar-Kharghan, V.; Sood, A.K. The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and Opportunities. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 965–983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Plantureux, L.; Mège, D.; Crescence, L.; Carminita, E.; Robert, S.; Cointe, S.; Brouilly, N.; Ezzedine, W.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; et al. The Interaction of Platelets with Colorectal Cancer Cells Inhibits Tumor Growth but Promotes Metastasis. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 291–303. [[CrossRef](#)]
15. Boulanger, C.M.; Amabile, N.; Tedgui, A. Circulating microparticles: A potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* **2006**, *48*, 180–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kuriyama, N.; Nagakane, Y.; Hosomi, A.; Ohara, T.; Kasai, T.; Harada, S.; Takeda, K.; Yamada, K.; Ozasa, K.; Tokuda, T.; et al. Evaluation of factors associated with elevated levels of platelet-derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2010**, *16*, 26–32. [[CrossRef](#)]
17. Hartopo, A.B.; Puspitawati, I.; Gharini, P.P.R.; Setianto, B.Y. Platelet microparticle number is associated with the extent of myocardial damage in acute myocardial infarction. *Arch. Med. Sci.* **2016**, *12*, 529–537. [[CrossRef](#)]
18. van der Zee, P.M.; Biró, E.; Ko, Y.; de Winter, R.J.; Hack, C.E.; Sturk, A.; Nieuwland, R. P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 657–664. [[CrossRef](#)]
19. Michelsen, A.E.; Notø, A.-T.; Brodin, E.; Mathiesen, E.B.; Brosstad, F.; Hansen, J.-B. Elevated levels of platelet microparticles in carotid atherosclerosis and during the postprandial state. *Thromb. Res.* **2009**, *123*, 881–886. [[CrossRef](#)]
20. Michelsen, A.E.; Brodin, E.; Brosstad, F.; Hansen, J.-B. Increased level of platelet microparticles in survivors of myocardial infarction. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **2008**, *68*, 386–392. [[CrossRef](#)]
21. Heeschen, C.; Dimmeler, S.; Hamm, C.W.; van den Brand, M.J.; Boersma, E.; Zeiher, A.M.; Simoons, M.L.; CAPTURE Study Investigators. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1104–1111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Melki, I.; Tessandier, N.; Zufferey, A.; Boilard, E. Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets* **2017**, *28*, 214–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Shantsila, E.; Kamphuisen, P.W.; Lip, G.Y.H. Circulating microparticles in cardiovascular disease: Implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **2010**, *8*, 2358–2368. [[CrossRef](#)]
24. Wang, Z.-T.; Wang, Z.; Hu, Y.-W. Possible roles of platelet-derived microparticles in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2016**, *248*, 10–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Del Bo', C.; Bernardi, S.; Marino, M.; Porrini, M.; Tucci, M.; Guglielmetti, S.; Cherubini, A.; Carrieri, B.; Kirkup, B.; Kroon, P.; et al. Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is there Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern? *Nutrients* **2019**, *11*, 1355. [[CrossRef](#)]
26. Poti, F.; Santi, D.; Spaggiari, G.; Zimetti, F.; Zanotti, I. Polyphenol Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Disorders: A Review and Meta-Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 351. [[CrossRef](#)]
27. Rienks, J.; Barbaresko, J.; Nöthlings, U. Association of Polyphenol Biomarkers with Cardiovascular Disease and Mortality Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients* **2017**, *9*, 415. [[CrossRef](#)]
28. Ostertag, L.M.; Kroon, P.A.; Wood, S.; Horgan, G.W.; Cienfuegos-Jovellanos, E.; Saha, S.; Duthie, G.G.; de Roos, B. Flavan-3-ol-enriched dark chocolate and white chocolate improve acute measures of platelet function in a gender-specific way—A randomized-controlled human intervention trial. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 191–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ostertag, L.M.; O'Kennedy, N.; Kroon, P.A.; Duthie, G.G.; de Roos, B. Impact of dietary polyphenols on human platelet function—A critical review of controlled dietary intervention studies. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 60–81. [[CrossRef](#)]
30. Singh, I.; Mok, M.; Christensen, A.-M.; Turner, A.H.; Hawley, J.A. The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2008**, *18*, 127–132. [[CrossRef](#)]

31. Aron, P.M.; Kennedy, J.A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 79–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ma, W.; Waffo-Téguo, P.; Jourdes, M.; Li, H.; Teissedre, P.-L. First evidence of epicatechin vanillate in grape seed and red wine. *Food Chem.* **2018**, *259*, 304–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1818–1892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mangels, D.R.; Mohler, E.R. Catechins as Potential Mediators of Cardiovascular Health. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, *37*, 757–763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bijak, M.; Dziedzic, A.; Saluk-Bijak, J. Flavonolignans reduce the response of blood platelet to collagen. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *106*, 878–884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bijak, M.; Szelenberger, R.; Saluk, J.; Nowak, P. Flavonolignans inhibit ADP induced blood platelets activation and aggregation in whole blood. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *95*, 682–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Olas, B.; Wachowicz, B.; Stochmal, A.; Oleszek, W. The polyphenol-rich extract from grape seeds inhibits platelet signaling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Platelets* **2012**, *23*, 282–289. [[CrossRef](#)]
38. Zhang, X.; McGeoch, S.C.; Megson, I.L.; MacRury, S.M.; Johnstone, A.M.; Abraham, P.; Pearson, D.W.M.; de Roos, B.; Holtrop, G.; O’Kennedy, N.; et al. Oat-enriched diet reduces inflammatory status assessed by circulating cell-derived microparticle concentrations in type 2 diabetes. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 1322–1332. [[CrossRef](#)]
39. Subcommittee on Control of Anticoagulation of the SSC of the ISTH. Towards a recommendation for the standardization of the measurement of platelet-dependent thrombin generation. *J. Thromb. Haemost.* **2011**, *9*, 1859–1861. [[CrossRef](#)]
40. Gyulkhandanyan, A.V.; Mutlu, A.; Freedman, J.; Leytin, V. Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *Br. J. Haematol.* **2013**, *161*, 245–254. [[CrossRef](#)]
41. Hemker, H.C.; Giesen, P.; Aldieri, R.; Regnault, V.; de Smed, E.; Wagenvoord, R.; Lecompte, T.; Béguin, S. The calibrated automated thrombogram (CAT): A universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **2002**, *32*, 249–253. [[CrossRef](#)]
42. Ed Nignpense, B.; Chinkwo, K.A.; Blanchard, C.L.; Santhakumar, A.B. Polyphenols: Modulators of Platelet Function and Platelet Microparticle Generation? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *21*, 146. [[CrossRef](#)]
43. Badimon, L.; Suades, R.; Crespo, J.; Padro, T.; Chiva-Blanch, G. Diet, microparticles and atherothrombosis. *Front. Biosci.* **2018**, *23*, 432–457. [[CrossRef](#)]
44. Voukalis, C.; Shantsila, E.; Lip, G.Y.H. Microparticles and cardiovascular diseases. *Ann. Med.* **2019**, *51*, 193–223. [[CrossRef](#)]
45. Dean, W.L.; Lee, M.J.; Cummins, T.D.; Schultz, D.J.; Powell, D.W. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb. Haemost.* **2009**, *102*, 711–718. [[CrossRef](#)]
46. Montoro-García, S.; Shantsila, E.; Tapp, L.D.; López-Cuenca, A.; Romero, A.I.; Hernández-Romero, D.; Orenes-Piñero, E.; Manzano-Fernández, S.; Valdés, M.; Marín, F.; et al. Small-size circulating microparticles in acute coronary syndromes: Relevance to fibrinolytic status, reparative markers and outcomes. *Atherosclerosis* **2013**, *227*, 313–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Porto, I.; Biasucci, L.M.; De Maria, G.L.; Leone, A.M.; Niccoli, G.; Burzotta, F.; Trani, C.; Tritarelli, A.; Vergallo, R.; Liuzzo, G.; et al. Intracoronary microparticles and microvascular obstruction in patients with ST elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous intervention. *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 2928–2938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Christersson, C.; Thulin, Å.; Siegbahn, A. Microparticles during long-term follow-up after acute myocardial infarction. Association to atherosclerotic burden and risk of cardiovascular events. *Thromb. Haemost.* **2017**, *117*, 1571–1581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Fernández, M.; Calligaris, S.D. Circulating microparticles in cardiovascular disease: Going on stage! *Biomarkers* **2019**, *24*, 423–428. [[CrossRef](#)]
50. Ivanov, I.I.; Apta, B.H.R.; Bonna, A.M.; Harper, M.T. Platelet P-selectin triggers rapid surface exposure of tissue factor in monocytes. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13397. [[CrossRef](#)]
51. Polgar, J.; Matuskova, J.; Wagner, D.D. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3*, 1590–1596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Owens, A.P.; Mackman, N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res.* **2011**, *108*, 1284–1297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Aleman, M.M.; Gardiner, C.; Harrison, P.; Wolberg, A.S. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability. *J. Thromb. Haemost.* **2011**, *9*, 2251–2261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Berckmans, R.J.; Nieuwland, R.; Böing, A.N.; Romijn, F.P.; Hack, C.E.; Sturk, A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb. Haemost.* **2001**, *85*, 639–646. [[PubMed](#)]
55. Macey, M.G.; Enniks, N.; Bevan, S. Flow cytometric analysis of microparticle phenotype and their role in thrombin generation. *Cytom. B Clin. Cytom.* **2011**, *80*, 57–63. [[CrossRef](#)]
56. Bijak, M.; Ziewiecki, R.; Saluk, J.; Ponczek, M.; Pawlaczyk, I.; Krotkiewski, H.; Wachowicz, B.; Nowak, P. Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 2324–2337. [[CrossRef](#)]
57. Sinegre, T.; Teissandier, D.; Milenkovic, D.; Morand, C.; Lebreton, A. Epicatechin influences primary hemostasis, coagulation and fibrinolysis. *Food Funct.* **2019**, *10*, 7291–7298. [[CrossRef](#)]
58. Qu, Z.; Liu, A.; Li, P.; Liu, C.; Xiao, W.; Huang, J.; Liu, Z.; Zhang, S. Advances in physiological functions and mechanisms of (-)-epicatechin. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, 1–23. [[CrossRef](#)]
59. Ottaviani, J.I.; Momma, T.Y.; Heiss, C.; Kwik-Urbe, C.; Schroeter, H.; Keen, C.L. The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 237–244. [[CrossRef](#)]
60. Borges, G.; Ottaviani, J.I.; van der Hooft, J.J.J.; Schroeter, H.; Crozier, A. Absorption, metabolism, distribution and excretion of (-)-epicatechin: A review of recent findings. *Mol. Aspects Med.* **2018**, *61*, 18–30. [[CrossRef](#)]
61. Ottaviani, J.I.; Borges, G.; Momma, T.Y.; Spencer, J.P.E.; Keen, C.L.; Crozier, A.; Schroeter, H. The metabolome of [2-(14)C]-(-)-epicatechin in humans: Implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Publication n°3

« Impact of epicatechin on fibrin clot structure »

T. Sinegre, D. Milenkovic, D. Teissandier, P. Fully, J. Bourdin, C. Morand, A. Lebreton

European Journal of Pharmacology, 2021 Feb 15;893:173830.

doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173830.

Résumé

La structure et la fonction du caillot de fibrine sont des déterminants majeurs des maladies thromboemboliques. En effet, un caillot de fibrine de structure altérée est régulièrement rapporté chez les patients atteints de complications thrombotiques artérielles ou veineuse. Le but de l'étude était de déterminer l'impact de l'épicatéchine, un flavonoïde appartenant au flavan-3-ols ayant des effets protecteurs cardiovasculaires, sur la structure et la perméabilité du caillot de fibrine.

Des échantillons de plasma provenant de 12 sujets sains ont été incubés avec des concentrations croissantes d'épicatéchine allant de 1 à 100 μM . La turbidité du caillot de fibrine a été analysée par mesure de l'absorbance à 405 nm. La nanostructure du caillot de fibrine a été déterminée par spectrophotométrie à balayage (longueur d'onde de 500 à 800 nm) et la taille des fibres de fibrine par microscopie électronique. Le test de perméabilité, évaluant la capacité d'écoulement à travers un caillot de fibrine, a permis d'analyser les propriétés fonctionnelles de ce dernier.

L'ajout *in vitro* d'épicatéchine à la concentration de 10 μM a augmenté l'absorbance maximale du caillot de fibrine, passant de $0,34 \pm 0,066$ (véhicule) à $0,35 \pm 0,072$ ($p < 0,05$). L'épicatéchine à 10 μM a augmenté le rayon de la fibre de fibrine (nm) de $109,2 \pm 3,2$ (véhicule) à $108,9 \pm 4,3$ ($p = 0,9$), $110,0 \pm 3,6$ ($p < 0,05$) et $109,5 \pm 3,3$ ($p = 0,4$), et la distance entre les protofibrilles (nm) de $22,2 \pm 1,5$ (véhicule) à $22,1 \pm 2,3$ ($p = 0,9$), $22,6 \pm 1,8$ ($p < 0,05$) et $22,3 \pm 1,8$ ($p = 0,9$) pour 1, 10

et 100 μM d'épicatéchine respectivement. La microscopie électronique a confirmé ces changements pour les concentrations 1 μM et 10 μM alors que l'on ne retrouvait pas d'impact de l'épicatéchine à très forte concentration. La perméabilité du caillot de fibrine, exprimée par la constante de Darcy (K_s , cm^2), est passée de $2,97 \pm 1,17$ (véhicule) à $3,36 \pm 1,21$ ($P < 0,05$), $3,81 \pm 1,41$ ($P < 0,01$) et $3,38 \pm 1,33$ ($P = 0,9$).

Au final, l'épicatéchine, essentiellement à la concentration de 10 μM , impacte la structure du caillot de fibrine le rendant moins dense avec des fibres plus épaisses et des pores plus larges. Cela a engendré d'un point de vue fonctionnel une perméabilité accrue du caillot dont la conséquence classiquement décrite est une augmentation de la sensibilité à la lyse.



Full length article

Impact of epicatechin on fibrin clot structure

Thomas Sinègre^{a,b,*}, Dragan Milenkovic^a, Dorian Teissandier^a, Pauline Fully^b, Julien Bourdin^b, Christine Morand^a, Aurélien Lebreton^{a,b}^a Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France^b CHU Clermont-Ferrand, Service D'hématologie Biologique, Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Cardiovascular disease
Coagulation
Epicatechin
Fibrin clot
Permeability
Turbidity

ABSTRACT

Fibrin clot structure and function are major determinants of thromboembolic diseases. The study aim was to determine the impact of epicatechin (a flavonoid with cardiovascular protective effects) on fibrin clot structure and permeability.

Plasma samples from 12 healthy subjects were incubated with increasing concentrations of epicatechin. Turbidity of fibrin clot was analyzed by absorbance measurement at 405 nm. The fibrin clot nanostructure was determined by scanning spectrometry (wavelength from 500 to 800 nm) and fibrin fiber size by electron microscopy. Permeability was analyzed to assess the fibrin clot functional properties.

Epicatechin addition increased the maximum absorbance from 0.34 ± 0.066 (vehicle) to 0.35 ± 0.077 ($P = 0.1$), 0.35 ± 0.072 ($P < 0.05$) and 0.34 ± 0.065 ($P = 0.5$) for 1, 10 and 100 μM epicatechin, respectively. Epicatechin increased the fibrin clot fiber radius (nm) from 109.2 ± 3.2 (vehicle) to 108.9 ± 4.3 ($P = 0.9$), 110.0 ± 3.6 ($P < 0.05$) and 109.5 ± 3.3 ($P = 0.4$), and the distance between protofibrils (nm) from 22.2 ± 1.5 (vehicle) to 22.1 ± 2.3 ($P = 0.9$), 22.6 ± 1.8 ($P < 0.05$) and 22.3 ± 1.8 ($P = 0.9$) for 1, 10 and 100 μM epicatechin respectively. Electron microscopy confirmed these changes. Fibrin clot permeability, expressed as Darcy's constant (K_s, cm^2), increased from 2.97 ± 1.17 (vehicle) to 3.36 ± 1.21 ($P < 0.05$), 3.81 ± 1.41 ($P < 0.01$) and 3.38 ± 1.33 ($P = 0.9$).

Upon epicatechin addition, the fibrin clot structure became less dense and more permeable.

1. Introduction

The hemostatic fibrin clot is formed after generation of the thrombin peak on the platelet surface following coagulation activation (Monroe and Hoffman, 2006). Upon clot formation initiation, fibrinogen is cleaved by thrombin into fibrinopeptide A and B to form fibrin monomers. These monomers assemble into half-staggered double-stranded oligomers to form protofibrils. This is followed by lateral aggregation within and between protofibrils, leading to fibrin fiber formation (Mihalko and Brown, 2020). Clot function and structure (e.g. thickness, porosity, density and resistance to lysis) are essential for its physiological role in bleeding control, fibrinolysis and wound healing. Fibrin clot properties are altered in various diseases, including venous and arterial thromboembolic disease (Undas and Ariens, 2011). Recent data indicate that the precise characterization of the fibrin clot is of particular interest for patient management, prognosis, and to predict the occurrence of complications (Baker et al., 2019; Undas, 2020). Specifically, clots

display a less permeable structure (Cieslik et al., 2018) and higher density, and they seem to be resistant to lysis (Siudut et al., 2016; Undas et al., 2009). The fibrin clot quality can also be a risk factor for cardiovascular disease (Mills et al., 2002) with reduced clot permeability and fibrinolysis (Bridge et al., 2014), and can be a predictor of anticoagulation efficacy and adverse clinical outcome in patients with atrial fibrillation and acute coronary syndrome (Sumaya et al., 2018).

Several reviews and meta-analyses highlighted the positive effect of a diet rich in flavonoids on cardiovascular risk and mortality (Del Bo' et al., 2019; Mozaffarian and Wu, 2018; Ottaviani et al., 2018). There is a growing body of evidence on the beneficial properties for cardiovascular health of flavan-3-ols, one of the major classes of dietary flavonoids. Epicatechin is one of the main representatives of this class, due to its wide distribution in a large variety of fruits and vegetables, such as tea and cocoa. Besides its anti-oxidant and anti-inflammatory activities (Natsume, 2018; Qu et al., 2020) that may affect fibrin clot (Undas et al., 2008), new evidence shows that epicatechin can also positively affect all

* Corresponding author. Service d'Hématologie biologique, CHU Estaing, 1 place Lucie et Raymond Aubrac, 63003, Clermont-Ferrand, France.
E-mail address: tsinegre@chu-clermontferrand.fr (T. Sinègre).

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173830>

Received 13 August 2020; Received in revised form 15 December 2020; Accepted 16 December 2020

Available online 1 January 2021

0014-2999/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

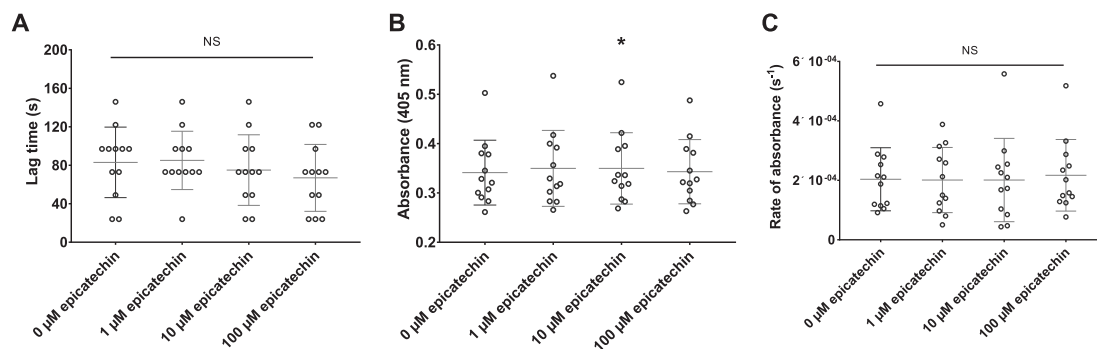


Fig. 1. Impact of epicatechin on turbidity parameters of fibrin clots.

A. Lag time (s). B. Maximum absorbance at 405 nm. C. Rate of absorbance (s⁻¹). NS, not significant, *P < 0.05 compared with vehicle.

hemostasis stages. Indeed, it has been reported that epicatechin decreases platelet aggregation, has an anticoagulant effect, and displays pro-fibrinolytic activity. This suggests a promising role in the prevention of the thrombogenicity of atherosclerotic plaques (Abou-Agag et al., 2001; Sinegre et al., 2019). Epicatechin might also inhibit the action of thrombin (Bijak et al., 2014; Mozzicafreddo et al., 2006) that with fibrinogen, is a key molecule in fibrin clot formation and structure. To the best of our knowledge, no study has assessed whether epicatechin can modulate fibrin clot structure and function. Thus, the aim of this study was to determine epicatechin effect on the fibrin clot structure evaluated by turbidity, electron microscopy and permeability assays.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Twelve healthy volunteers, 7 women and 5 men (mean age: 33 years [20–46]), were enrolled in 2018 to provide blood samples. Exclusion criteria were history of bleeding and thromboembolism, ongoing anti-platelet drug or anticoagulant therapy, and abnormal blood counts including thrombocytopenia <150 G/L and coagulation disturbances (fibrinogen <2.0 g/L, prothrombin time >15.5 s, activated partial thromboplastin time >40 s). All experiments were performed in accordance with the French laws and approved by the ethics committee of the university hospital of Clermont-Ferrand (Comité de Protection des Personnes Sud-Est VI, ref. AU765). Informed consents were obtained from all human participants of this study.

2.2. Blood sampling and plasma preparation

Blood was collected by venipuncture in 0.109 M citrate tubes (Beckton Dickinson, le Pont de Claix, France) after discarding the first few milliliters. Platelet-poor plasma (PPP) was prepared by double centrifugation (2500 g, 21 °C for 15 min) with an intermediate step of plasma decantation, according to the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) guidelines (Subcommittee on Control of Anticoagulation of the SSC of the ISTH, 2011). PPP samples were stored, at –80 °C until testing (less than 3 month). Before the experiments, frozen plasma samples were thawed in a water bath at 37 °C for 5 min.

A stock solution of epicatechin (12.5 mM in DMSO) was diluted with phosphate buffered saline to 0.1, 1 and 10 mM working solutions that were used to supplement the plasma samples to reach the target concentrations of 1, 10 and 100 µM with a constant 1/100 dilution. An equivalent volume of vehicle was added to the baseline samples without epicatechin. Before each experiment, plasma samples were incubated with epicatechin at 37 °C for 10 min.

2.3. Turbidity assay

Clot formation kinetics was monitored in 96-well plates with a flat

bottom (Greiner Bio-One). As described by Pieters et al. (2018), plasma was diluted in buffer (final dilution 3 : 10) and coagulation was initiated by adding thrombin and calcium at the final concentration of 0.5 NIH U/ml and 15 mM, respectively. After stirring, absorbance was measured at 37 °C on a spectrophotometer (Spark, Tecan, Switzerland) at 405 nm every 10 s for 120 min. The main parameters were the lag time (from the start to when absorbance increased 0.015 from baseline), the slope calculated at the midpoint, and the maximum absorbance. All tests were performed in duplicate with a coefficient of variation <5%.

2.4. Fibrin fiber nanostructure analysis

The fibrin clot nanostructure was investigated by scanning spectrometry as described by Yeromonahos et al. (2010). Briefly, fibrin clots were formed in 96-well plates with a flat bottom (Greiner Bio-One) from diluted plasma (1 : 6) to which thrombin and calcium were added at the final concentration of 0.5 NIH U/ml and 10 mM, respectively. After incubation at 37 °C for 90 min, clots were scanned over wavelengths ranging from 500 to 800 nm, every 1 nm (Spark). In parallel, in order to study the specific role of thrombin, the clot was also formed in the same way by replacing thrombin with reptilase (0.5 Batroxobine U/ml; Stago, Aisnières, France). The primary endpoints included the average fiber radius, number of protofibrils in fibers, and distance between fibers. All tests were performed in triplicate with a coefficient of variation <5%.

2.5. Electron microscopy

The plasma clot structure was analyzed by electron microscopy. Clots were formed by adding thrombin and calcium at the final concentration of 0.7 NIH U/ml and 15 mM, respectively, in the presence of increasing final concentrations of epicatechin. Clots were washed with TBS for 2 h and fixed in 2% glutaraldehyde at 20 °C for 2 h and gradually desiccated. Then, clots were sputter coated with 10 nm gold-palladium (JFC-1300, JEOL, Tokyo, Japan) and examined with an electron microscope (JSM-6060LV, JEOL). Experiments were performed in duplicate.

2.6. Fibrin clot permeability

Fibrin clot permeability was tested using a pressure-driven system, as described by Pieters et al. (2012). Briefly, fibrin clots were formed in a tube from 100 µl of plasma by addition of 10 µl of activation mixture containing thrombin and calcium at the final concentration of 1.0 NIH U/ml and 20 mM, respectively. After incubation at 37 °C in a wet chamber for 2 h, tubes containing clots were connected to a reservoir containing Tris-HCL buffer (0.05 M Tris-HCL, 0.10 NaCl, pH 7.5). After an initial wash, the volume of buffer that passed through the clots, under constant pressure (4 cm H₂O), was measured for 2 h. The permeability coefficient (Ks; cm²), which reflects the fibrin network in the clot and particularly the pore size, was determined using Darcy's law: Ks = Q x L

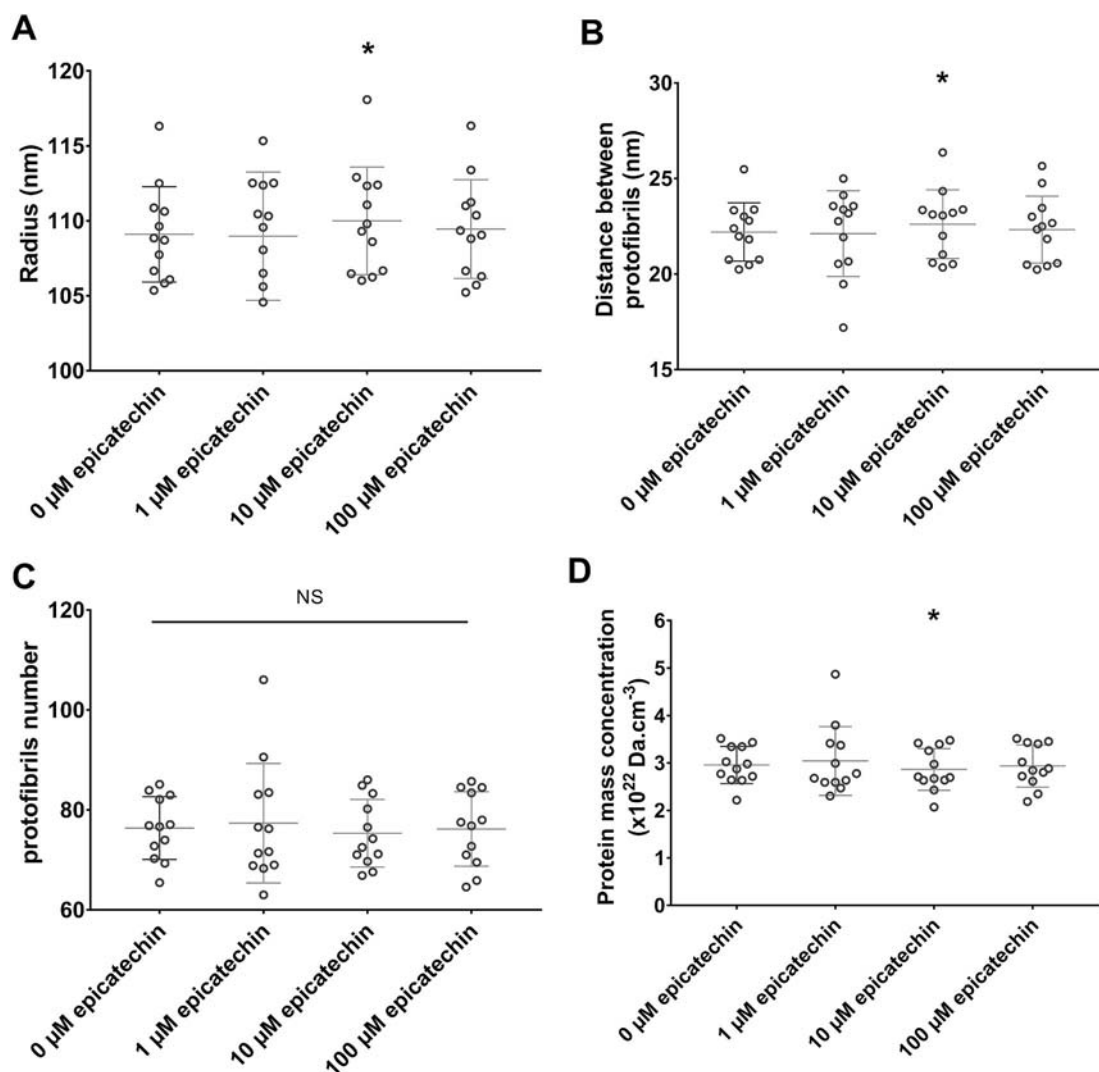


Fig. 2. Impact of epicatechin on the nanostructure of a thrombin-induced fibrin clot.

A. Fiber radius (nm). B. Distance between protofibrils (nm). C. Protofibril number. D. Protein mass concentration ($\text{Da}\cdot\text{cm}^{-3}$). NS, not significant, $*P < 0.05$ compared with vehicle.

$x \eta / (t \times A \times \Delta p)$, where Q is the volume of buffer collected in time t , L is the fibrin clot length, η is the liquid viscosity, A is the cross-sectional area of the clot container, and Δp the pressure drop. All tests were performed in quadruplicate with a coefficient of variation $< 10\%$.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the Prism software, version 6 (GraphPad software, Inc., La Jolla, USA). Tests were two-sided, with a type I error set at $\alpha = 0.05$. Data were presented as mean \pm standard deviation (S.D.). The statistical significance of differences between classes was determined with ANOVA or the Friedman test, followed by the appropriate multiple-comparison post-hoc, Tukey-Kramer or Dunn test.

3. Results

3.1. Epicatechin impact on turbidity assays

The turbidity kinetic analysis by measuring absorbance over time after incubation or not with epicatechin (Fig. 1) indicated that the mean maximum absorbance at 405 nm increased from 0.34 ± 0.066 for vehicle to 0.35 ± 0.077 ($P = 0.10$), 0.35 ± 0.072 ($P < 0.05$), and $0.34 \pm$

0.065 ($P = 0.5$) for 1 μM , 10 μM and 100 μM epicatechin, respectively. Epicatechin did not have any effect on lag time (in s) [83.0 ± 36.7 for vehicle versus 85.1 ± 30.3 ($P = 0.99$), 75.0 ± 36.7 ($P = 0.77$), 66.9 ± 34.8 ($P = 0.33$)] and on absorbance rate (s^{-1}) [2.0 ± 1.1 for vehicle versus 2.0 ± 1.1 ($P = 0.99$), 2.0 ± 1.4 ($P = 0.99$) and 2.2 ± 1.2 ($P = 0.62$), for 1 μM , 10 μM and 100 μM epicatechin, respectively].

3.2. Epicatechin impact on fibrin fiber nanostructure

Analysis of the fibrin fiber nanostructure thrombin-induced by absorbance measurement after incubation or not with epicatechin (Fig. 2) showed that the fibrin fiber radius (nm) [109.1 ± 3.2 for vehicle versus 108.9 ± 4.3 ($P = 0.99$), 110.0 ± 3.6 ($P < 0.05$) and 109.5 ± 3.3 ($P = 0.41$)] and the distance between protofibrils (nm) [22.2 ± 1.5 for vehicle versus 22.1 ± 2.3 ($P = 0.99$), 22.6 ± 1.8 ($P < 0.05$) and 22.3 ± 1.8 ($P = 0.86$) for 1 μM , 10 μM and 100 μM epicatechin, respectively] were significantly increased only in samples incubated with 10 μM epicatechin. The protein mass concentration ($\text{Da}\cdot\text{cm}^{-3}$) was significantly decreased only after incubation with 10 μM epicatechin [3.0 ± 0.4 for vehicle versus 3.0 ± 0.7 ($P = 0.89$), 2.8 ± 0.4 ($P < 0.05$) and 2.9 ± 0.4 ($P = 0.94$) for 1 μM , 10 μM and 100 μM epicatechin, respectively], whereas the number of protofibrils was similar in all conditions (between 75 and 77).

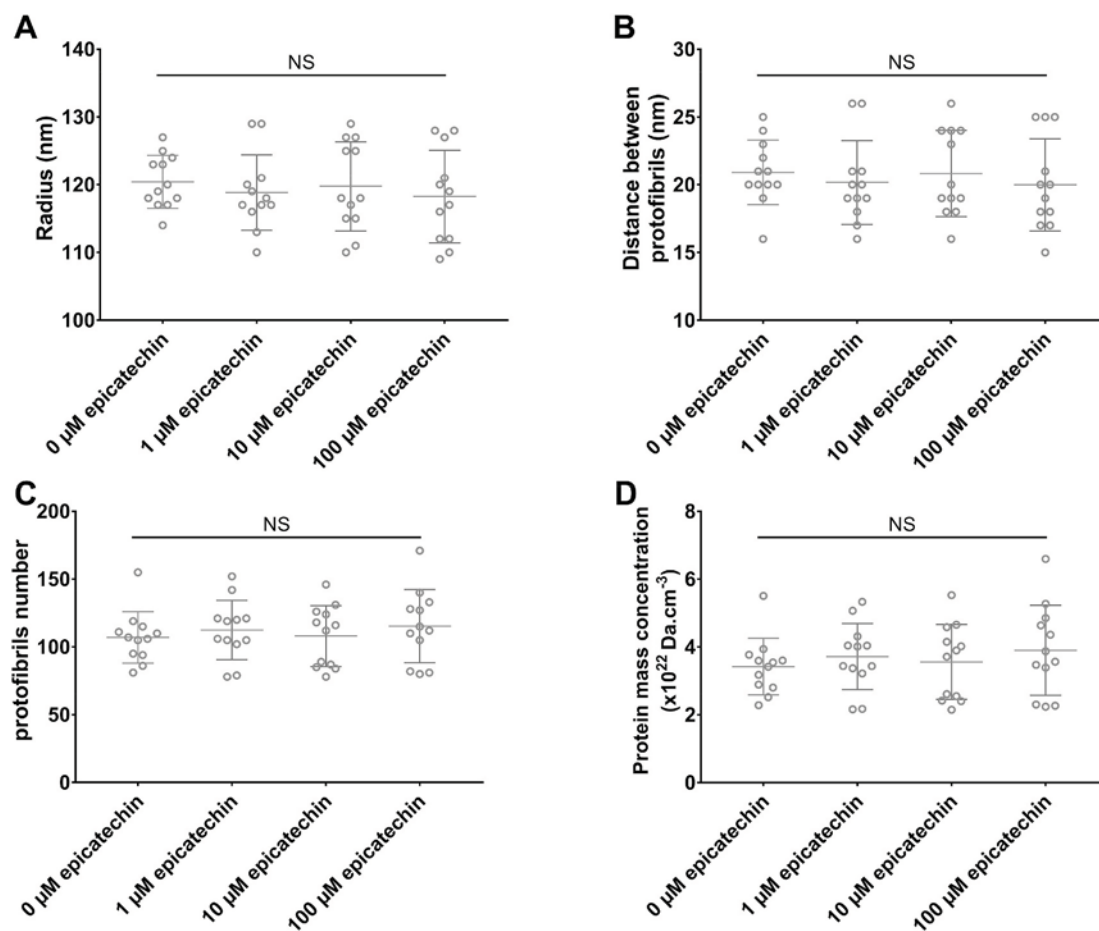


Fig. 3. Impact of epicatechin on the nanostructure of a reptilase-induced fibrin clot.

A. Fiber radius (nm). B. Distance between protofibrils (nm). C. Protofibril number. D. Protein mass concentration ($\text{Da}\cdot\text{cm}^{-3}$). NS, not significant.

No impact of epicatechin on the structural parameters of the clot reptilase-induced was found whatever the concentration (Fig. 3). These results support an impact of epicatechin on the structure of the fibrin clot through its action on thrombin.

The plasma clot structural analysis by electron microscopy after incubation or not with epicatechin (Fig. 4) showed that the fiber diameter ($n = 100$ fibers/condition) was increased after incubation with 1 μM and 10 μM epicatechin: 81.7 ± 13.0 for vehicle versus 88.9 ± 10.9 ($P < 0.01$), 95.5 ± 12.0 ($P < 0.001$) and 78.5 ± 12.9 ($P = 0.37$) for 1 μM , 10 μM and 100 μM epicatechin, respectively.

3.3. Impact of epicatechin on fibrin clot permeability

The pore size within fibrin clots was estimated by measuring permeability (K_s ; cm^2) after incubation or not with epicatechin (Fig. 5). Permeability was significantly increased after incubation with 1 μM and 10 μM epicatechin: 2.97 ± 1.17 for vehicle versus 3.36 ± 1.21 ($P < 0.05$), 3.81 ± 1.41 ($P < 0.01$) and 3.38 ± 1.33 ($P = 0.99$) for 1 μM , 10 μM and 100 μM epicatechin, respectively.

4. Discussion

Cardiovascular diseases and venous thromboembolism are leading causes of death worldwide. There is growing evidence that the fibrin clot architecture is a major determinant of arterial and venous thromboembolic diseases and could represent an essential parameter in patient monitoring (Undas and Ariens, 2011). The present study investigated epicatechin effect on fibrin clot structure and function. Epicatechin is a major flavonoid compound with extensively documented cardiovascular

protective effects (Qu et al., 2020). Few previous studies examined the impact of other flavonoids (e.g. flavonols and flavones) on fibrin clot and reported an inhibitory effect on the polymer formation by turbidimetry and microscopy analyses. Conversely, no information was available on epicatechin (Choi et al., 2015a, 2015b, 2015c).

Our turbidity data indicate that epicatechin increases the maximum absorbance, but does not affect the absorbance rate. The maximum absorbance value should reflect clot growth and partly the fibrin fiber diameter (Zabczyk and Undas, 2017). However, its meaning is debated because of the many involved determinants and the different analytical conditions (Mihalko and Brown, 2020; Pieters et al., 2020). Nevertheless, our turbidity results are in agreement with our structural analysis of plasma clots that highlighted an increase in the fiber radius associated with higher distance between protofibrils upon incubation with epicatechin. Of note, the impact of epicatechin on the fibrin clot structure is comparable to the effect obtained by an anticoagulant therapy, although the effect size of epicatechin remains smaller (Supplementary Table 1). Similarly, the electron microscopy analysis showed a progressive increase in fiber size after incubation with up to 10 μM epicatechin, and then a reduction with 100 μM epicatechin. These results are in agreement with the previously reported profibrinolytic effect of epicatechin (Sinegre et al., 2019) that seems to hinder the thrombogenic clot formation with thin fibers and ultimately prevents the normal course of the fibrinolytic process (Collet et al., 2000). Finally, these structural data on the fibrin clot are consistent with the observed permeability characteristics where porosity increased after incubation with up to 10 μM epicatechin, whereas higher concentrations did not have any effect. These results corroborate the potential beneficial effects of epicatechin on clot sensitivity to lysis, and were obtained using different experimental

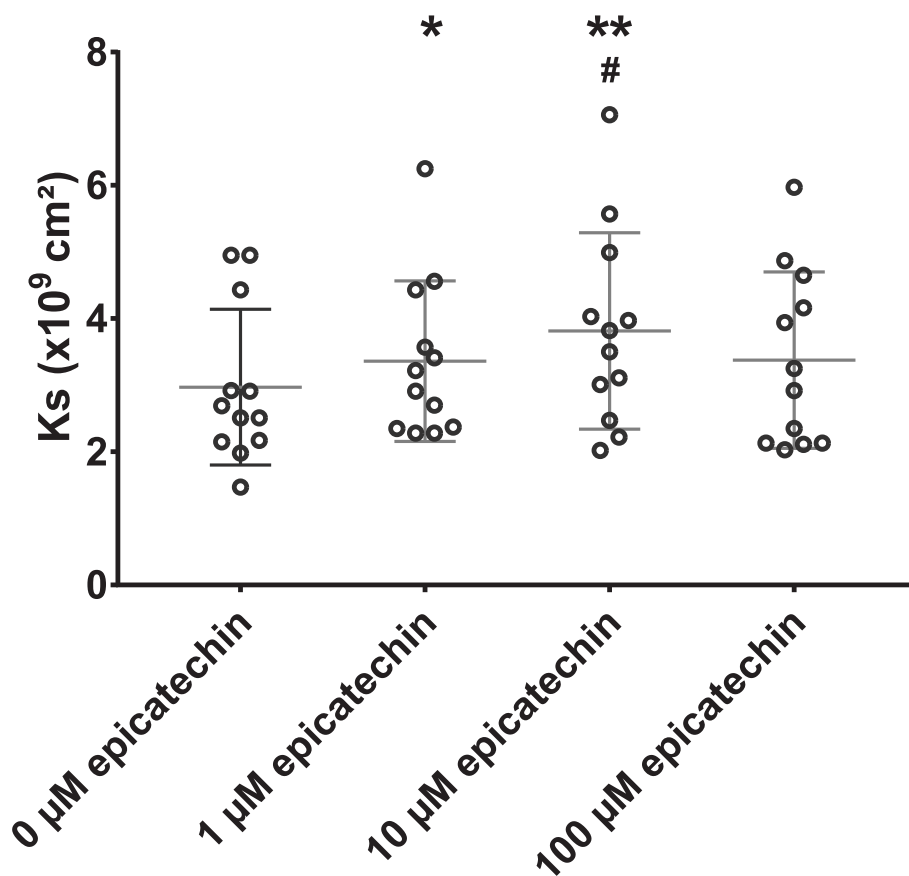


Fig. 4. Impact of epicatechin on fiber size within the fibrin clot by electron microscopy.

The clot structure is analyzed with an electron microscope x10 000. A. Vehicle. B. 1 μM Epicatechin. C. 10 μM Epicatechin. D. 100 μM Epicatechin.

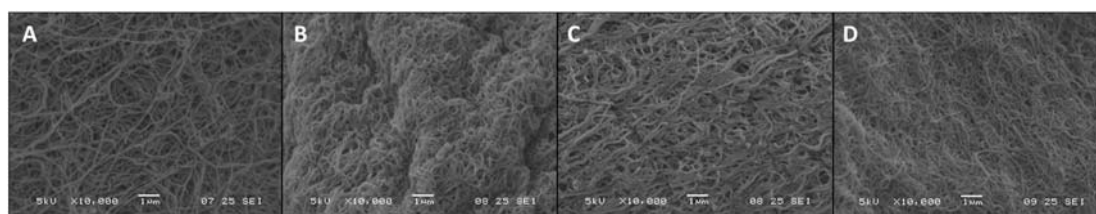


Fig. 5. Impact of epicatechin on fibrin clot permeability.

Pore size is expressed as Darcy's constant (Ks). *P < 0.05, **P < 0.01 compared with vehicle. #P < 0.05 compared with 1 μM Epicatechin.

methods without and with clot desiccation (electron microscopy) (Undas, 2016, 2020).

Altogether, our results suggest that epicatechin at low (1 μM) to moderate (10 μM) concentrations positively modulates fibrin clot formation, while epicatechin appears to be ineffective at the highest concentration (100 μM). This bell-shaped response curve has already been described for flavonoids, arguing a possible desensitization at high concentrations (Claude et al., 2014). Our previous work showed that epicatechin decreases thrombin generation (Sinigre et al., 2019), and this could constitute a preferential mechanism for the epicatechin-mediated formation of thicker fibrin fibers (Domingues et al., 2016). This hypothesis is consistent with the absence of impact on nanostructure of reptilase-induced fibrin clot and the reported effects of drugs, particularly anticoagulants, that decrease thrombin generation (Undas, 2014; Undas and Zabczyk, 2018). Moreover, fibrinogen is also a major determinant of the clot and thrombotic disease (Ariens, 2013), and its concentration, polymorphisms or mutations can alter the fibrin clot quality (Allan et al., 2012; Lim et al., 2003). Fibrinogen post-translational modifications, notably oxidation to which fibrinogen

is particularly susceptible, also may impact fibrin clot structure, permeability, and sensitivity to lysis (de Vries et al., 2020). Therefore, due its anti-inflammatory and antioxidant properties, epicatechin might also interfere with the fibrin clot characteristics (Undas et al., 2008).

The choice to work on plasma of healthy subjects could induce a potential bias, therefore our results must be confirmed in patients with thromboembolic diseases. Moreover, Ottaviani et al. (2016) established epicatechin pharmacokinetic profile and described more than 20 different metabolites in plasma. These epicatechin-derived metabolites originate from the action of phase II and gut microbial enzymes. Some of these derivatives might be involved in mediating epicatechin beneficial properties on fibrin clot *in vivo*; however, as these molecules are not commercially available, they could not be tested in this study. Therefore, rather than a short *in vitro* exposure at high epicatechin concentrations, the effect of long-term *in vivo* exposure to physiological epicatechin concentrations including its metabolites deserves to be explored.

In conclusion, our study demonstrated that epicatechin affects the fibrin clot structure making it more permeable, less dense, and

consequently more sensitive to lysis. Due to the fibrin clot importance in cardiovascular diseases, as the thrombogenesis end point, an *in vivo* study needs to be carried out to confirm epicatechin beneficial role and to overcome the incapacity to test *in vitro* the plasma metabolites of epicatechin.

Author contributions

Conceptualization, T.S. and A.L.; methodology, T.S., J.B. and P.F.; validation, C.M. and A.L.; writing—original draft preparation, T.S., A.L., and C.M.; writing—review and editing, T.S., A.L., C.M., D.T. and D.M.; funding acquisition, A.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This study was supported by a grant from Octapharma.

CRediT authorship contribution statement

Thomas Sinigre: Conceptualization, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Dragan Milenkovic:** Writing - review & editing. **Dorian Teissandier:** Writing - review & editing. **Pauline Fully:** Methodology. **Julien Bourdin:** Methodology. **Christine Morand:** Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Aurélien Lebreton:** Conceptualization, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

None. The funder had no role in the study.

Acknowledgments

Authors sincerely thank the staff of INRA UNH at Theix, the technical staff of the hemostasis department (University hospital of Clermont-Ferrand), the Centre Imagerie Cellulaire Santé and Christelle Blavignac for microscopy assays and Elisabetta Andermarcher for American English editing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173830>.

References

- Abou-Agag, L.H., Aikens, M.L., Tabengwa, E.M., Benza, R.L., Shows, S.R., Grenett, H.E., Booyse, F.M., 2001. Polyphenolics increase t-PA and u-PA gene transcription in cultured human endothelial cells. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25, 155–162.
- Allan, P., Uitte de Willige, S., Abou-Saleh, R.H., Connell, S.D., Ariëns, R.A.S., 2012. Evidence that fibrinogen γ' directly interferes with protofibril growth: implications for fibrin structure and clot stiffness. *J. Thromb. Haemostasis* 10, 1072–1080. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04717.x>.
- Ariëns, R.A.S., 2013. Fibrin(ogen) and thrombotic disease. *J. Thromb. Haemostasis* 11 (Suppl. 1), 294–305. <https://doi.org/10.1111/jth.12229>.
- Baker, S.R., Zabczyk, M., Macrae, F.L., Duval, C., Undas, A., Ariëns, R.A.S., 2019. Recurrent venous thromboembolism patients form clots with lower elastic modulus than those formed by patients with non-recurrent disease. *J. Thromb. Haemostasis* 17, 618–626. <https://doi.org/10.1111/jth.14402>.
- Bijak, M., Ziewiecki, R., Saluk, J., Poncek, M., Pawlaczyk, I., Krotkiewski, H., Wachowicz, B., Nowak, P., 2014. Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds. *Med. Chem. Res.* 23, 2324–2337. <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0829-4>.
- Bridge, K.I., Philippou, H., Ariëns, R.A.S., 2014. Clot properties and cardiovascular disease. *Thromb. Haemostasis* 112, 901–908. <https://doi.org/10.1160/TH14-02-0184>.
- Choi, J.-H., Kim, D.-W., Park, S.-E., Lee, H.-J., Kim, K.-M., Kim, K.-J., Kim, M.-K., Kim, S.-J., Kim, S., 2015a. Anti-thrombotic effect of rutin isolated from *Dendropanax morbifera* Leveille. *J. Biosci. Bioeng.* 120, 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.12.012>.
- Choi, J.-H., Kim, Y.-S., Shin, C.-H., Lee, H.-J., Kim, S., 2015b. Antithrombotic activities of luteolin *in vitro* and *in vivo*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 29, 552–558. <https://doi.org/10.1002/jbt.21726>.
- Choi, J.-H., Park, S.-E., Kim, S.-J., Kim, S., 2015c. Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. *Biochimie* 115, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.06.001>.
- Cieslik, J., Mrozinska, S., Broniatowska, E., Undas, A., 2018. Altered plasma clot properties increase the risk of recurrent deep vein thrombosis: a cohort study. *Blood* 131, 797–807. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-798306>.
- Claude, S., Boby, C., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Gérard, N., Morand, C., Milenkovic, D., 2014. Flavanol metabolites reduce monocyte adhesion to endothelial cells through modulation of expression of genes via p38-MAPK and p65-Nf-kB pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 1016–1027. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300658>.
- Collet, J.P., Park, D., Lesty, C., Soria, J., Soria, C., Montalescot, G., Weisel, J.W., 2000. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1354–1361. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.5.1354>.
- de Vries, J.J., Snoek, C.J.M., Rijken, D.C., de Maat, M.P.M., 2020. Effects of post-translational modifications of fibrinogen on clot formation, clot structure, and fibrinolysis: a systematic review. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40, 554–569. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313626>.
- Del Bo, C., Bernardi, S., Marino, M., Porrini, M., Tucci, M., Guglielmetti, S., Cherubini, A., Carrieri, B., Kirkup, B., Kroon, P., Zamora-Ros, R., Hidalgo Liberona, N., Andres-Lacueva, C., Riso, P., 2019. Systematic review on polyphenol intake and health outcomes: is there sufficient evidence to define a health-promoting polyphenol-rich dietary pattern? *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11061355>.
- Domingues, M.M., Macrae, F.L., Duval, C., McPherson, H.R., Bridge, K.I., Ajjan, R.A., Ridger, V.C., Connell, S.D., Philippou, H., Ariëns, R.A.S., 2016. Thrombin and fibrinogen γ' impact clot structure by marked effects on intrafibrillar structure and protofibril packing. *Blood* 127, 487–495. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-652214>.
- Lim, B.C.B., Ariëns, R.A.S., Carter, A.M., Weisel, J.W., Grant, P.J., 2003. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet* 361, 1424–1431. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13135-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13135-2).
- Mihalko, E., Brown, A.C., 2020. Clot structure and implications for bleeding and thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* 46, 96–104. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1696944>.
- Mills, J.D., Ariëns, R.A.S., Mansfield, M.W., Grant, P.J., 2002. Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 106, 1938–1942. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000033221.73082.06>.
- Monroe, D.M., Hoffman, M., 2006. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 41–48. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000193624.28251.83>.
- Mozaffarian, D., Wu, J.H.Y., 2018. Flavonoids, dairy foods, and cardiovascular and metabolic health: a review of emerging biologic pathways. *Circ. Res.* 122, 369–384. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309008>.
- Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., Eleuteri, A.M., Fioretti, E., Angeletti, M., 2006. Flavonoids inhibit the amidolytic activity of human thrombin. *Biochimie* 88, 1297–1306. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.04.007>.
- Natsume, M., 2018. Polyphenols: inflammation. *Curr. Pharmaceut. Des.* 24, 191–202. <https://doi.org/10.2174/1381612823666171109104141>.
- Ottaviani, J.I., Borges, G., Momma, T.Y., Spencer, J.P.E., Keen, C.L., Crozier, A., Schroeter, H., 2016. The metabolome of [2-(14)C]-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Sci. Rep.* 6, 29034. <https://doi.org/10.1038/srep29034>.
- Ottaviani, J.I., Heiss, C., Spencer, J.P.E., Kelm, M., Schroeter, H., 2018. Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: Revisited. *Mol. Aspect. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.02.001>.
- Pieters, M., Guthold, M., Nunes, C.M., de Lange, Z., 2020. Interpretation and validation of maximum absorbance data obtained from turbidimetry analysis of plasma clots. *Thromb. Haemostasis* 120, 44–54. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1698460>.
- Pieters, M., Philippou, H., Undas, A., de Lange, Z., Rijken, D.C., Mutch, N.J., Subcommittee on Factor XIII and Fibrinogen, and the Subcommittee on Fibrinolysis, 2018. An international study on the feasibility of a standardized combined plasma clot turbidity and lysis assay: communication from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemostasis* 16, 1007–1012. <https://doi.org/10.1111/jth.14002>.
- Pieters, M., Undas, A., Marchi, R., De Maat, M.P.M., Weisel, J.W., Ariëns, R.A.S., Factor XIII And Fibrinogen Subcommittee Of The Scientific Standardisation Committee Of The International Society For Thrombosis And Haemostasis, 2012. An international study on the standardization of fibrin clot permeability measurement: methodological considerations and implications for healthy control values. *J. Thromb. Haemostasis* 10, 2179–2181.
- Qu, Z., Liu, A., Li, P., Liu, C., Xiao, W., Huang, J., Liu, Z., Zhang, S., 2020. Advances in physiological functions and mechanisms of (-)-epicatechin. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1–23. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1723057>.
- Sinigre, T., Teissandier, D., Milenkovic, D., Morand, C., Lebreton, A., 2019. Epicatechin influences primary hemostasis, coagulation and fibrinolysis. *Food Funct* 10, 7291–7298. <https://doi.org/10.1039/c9fo00816k>.
- Siudut, J., Grela, M., Wypasek, E., Plens, K., Undas, A., 2016. Reduced plasma fibrin clot permeability and susceptibility to lysis are associated with increased risk of postthrombotic syndrome. *J. Thromb. Haemostasis* 14, 784–793. <https://doi.org/10.1111/jth.13264>.

- Subcommittee on Control of Anticoagulation of the SSC of the ISTH, 2011. Towards a recommendation for the standardization of the measurement of platelet-dependent thrombin generation. *J. Thromb. Haemostasis* 9, 1859–1861. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04427.x>.
- Sumaya, W., Wallentin, L., James, S.K., Siegbahn, A., Gabrysch, K., Bertilsson, M., Himmelmann, A., Ajjan, R.A., Storey, R.F., 2018. Fibrin clot properties independently predict adverse clinical outcome following acute coronary syndrome: a PLATO substudy. *Eur. Heart J.* 39, 1078–1085. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy013>.
- Undas, A., 2020. Altered fibrin clot properties and fibrinolysis in patients with atrial fibrillation: practical implications. *Europace* 22, 185–194. <https://doi.org/10.1093/europace/euz271>.
- Undas, A., 2016. How to assess fibrinogen levels and fibrin clot properties in clinical practice? *Semin. Thromb. Hemost.* 42, 381–388. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579636>.
- Undas, A., 2014. Fibrin clot properties and their modulation in thrombotic disorders. *Thromb. Haemostasis* 112, 32–42. <https://doi.org/10.1160/TH14-01-0032>.
- Undas, A., Ariens, R.A.S., 2011. Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, e88–99. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.230631>.
- Undas, A., Szuldrzynski, K., Stepień, E., Zalewski, J., Godlewski, J., Tracz, W., Pasowicz, M., Zmudka, K., 2008. Reduced clot permeability and susceptibility to lysis in patients with acute coronary syndrome: effects of inflammation and oxidative stress. *Atherosclerosis* 196, 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.05.028>.
- Undas, A., Zabczyk, M., 2018. Antithrombotic medications and their impact on fibrin clot structure and function. *J. Physiol. Pharmacol.* 69 <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.4.02>.
- Undas, A., Zawilska, K., Ciesla-Dul, M., Lehmann-Kopydłowska, A., Skubiszak, A., Ciepluch, K., Tracz, W., 2009. Altered fibrin clot structure/function in patients with idiopathic venous thromboembolism and in their relatives. *Blood* 114, 4272–4278. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-222380>.
- Yeromonahos, C., Polack, B., Caton, F., 2010. Nanostructure of the fibrin clot. *Biophys. J.* 99, 2018–2027. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.059>.
- Zabczyk, M., Undas, A., 2017. Plasma fibrin clot structure and thromboembolism: clinical implications. *Pol. Arch. Intern. Med.* 127, 873–881. <https://doi.org/10.20452/pamw.4165>.

DISCUSSION

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer l'impact *in vitro* de l'épicatéchine sur le phénotype hémostatique des 3 principales étapes, l'hémostase primaire, la coagulation plasmatique et la fibrinolyse.

Il a été montré depuis plusieurs années que l'alimentation, particulièrement lorsqu'elle est riche en flavonoïdes, impacte favorablement l'étape d'hémostase primaire, notamment au niveau de l'activation et de l'agrégation plaquettaire (McEwen, 2014). Cependant les méthodologies disparates, ne serait-ce qu'au sein des techniques d'agrégation plaquettaire, rendent compliquées l'interprétation des résultats (Tableau 1).

Les études *in vivo*, notamment réalisées suite à l'ingestion de chocolat noir riche en flavan-3-ols, montrent un impact sur l'agrégation plaquettaire au collagène (Heptinstall et al., 2006; Innes et al., 2003; Murphy et al., 2003), une absence d'inhibition avec 1 mM d'acide arachidonique (Murphy et al., 2003) et des résultats discordants avec l'ADP. Lorsque l'agrégation plaquettaire est réalisée sur plasma riche en plaquettes ajusté et induite par de faibles concentrations d'ADP (jusqu'à 2 μ M) aucune inhibition de l'agrégation plaquettaire n'est observée, au contraire de la concentration 8 μ M qui montre un impact du chocolat noir lorsque l'agrégation plaquettaire est réalisée en sang total. Les expérimentations *in vitro* évaluant, l'effet de mélanges complexes de flavonoïdes (incluant l'épicatéchine), tels que l'extrait de pépins de raisin ou le thé vert, montrent des résultats d'agrégation plaquettaire sur plaquettes lavées concordants. Plusieurs équipes ont en effet montré une inhibition lorsque l'agrégation est induite par 0,1 à 0,5 UI/mL de thrombine (Bijak et al., 2013; Kang et al., 2001; Olas et al., 2012b). Olas et coll. mettent également en évidence une inhibition avec le TRAP (Olas et al., 2012b), et Kang et coll. avec le calcium ionophore A23187, le collagène et l'ADP aux fortes concentrations (Kang et al., 2001). Les expérimentations évaluant l'impact spécifique de l'épicatéchine montrent des résultats variables selon les agonistes. L'agrégation plaquettaire induite par le collagène est inhibée de manière concordante entre Heptinstall et coll. et notre équipe. Les effets sont significatifs pour la même concentration en épicatéchine de 100 μ M même si la concentration en collagène varie - 0,5 versus 2,0 μ g/mL - ainsi que la technique - sang total

versus plasma riche en plaquettes, respectivement (Heptinstall et al., 2006; Sinegre et al., 2019). Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Neiva et coll. qui montrent une inhibition par l'épicatechine (100 μ M versus 170 μ M, respectivement) lorsque l'agrégation est induite par l'ADP 2 μ M ou 3 μ M, et ceci bien qu'ils travaillent sur un plasma riche en plaquettes dont le taux de plaquettes est ajusté. De la même manière nos résultats sont similaires pour l'épinéphrine (6 μ M ou 5 μ M). Pour l'acide arachidonique nos résultats sont néanmoins discordants avec la littérature. En effet, de façon similaire à Murphy et coll. qui travaillaient sur sang total, nous ne retrouvons pas d'inhibition à l'agrégation induite par 1 mM d'acide arachidonique. Cela peut être expliqué par notre concentration en épicatechine inférieure à celle de Neiva et coll. (100 μ M versus 170 μ M, respectivement) ou par des différences de méthodologie. Ces derniers utilisaient un plasma riche en plaquettes ajusté et une concentration en agoniste inférieure (Neiva et al., 1999; Sinegre et al., 2019). Nos résultats avec le TRAP montrent une inhibition et sont concordants avec ceux de Olas et coll. sur les pépins de raisin malgré les différences dans les techniques utilisées. Enfin, contrairement aux études sur extraits contenant un mélange de flavonoïdes (Bijak et al., 2013; Kang et al., 2001; Olas et al., 2012b), Bijak et coll. ne trouve pas d'impact de l'épicatechine 100 et 1000 μ M sur l'agrégation induite par la thrombine (M. Bijak et al., 2014b). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces différences. Tout d'abord que l'épicatechine à forte concentration 100 – 1000 μ M n'impacte pas l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine, la concentration supposée en épicatechine des extraits n'excédant pas le micromolaire. La matrice au sein de laquelle est contenue l'épicatechine ainsi qu'un éventuel effet synergique avec les autres flavonoïdes pourrait également jouer un rôle. Cependant, le fait que l'épicatechine puisse inhiber l'agrégation plaquettaire induite par TRAP ne semble pas compatible avec cette hypothèse (Olas et al., 2012b; Sinegre et al., 2019). Par ailleurs, bien que ces équipes aient toutes travaillé sur plaquettes lavées, les méthodologies ne sont pas uniformes au niveau du prélèvement ou de la concentration en plaquettes du plasma.

Les différences de méthodologies pouvant être à l'origine de résultats contradictoires, nous avons fait le choix de nous appuyer sur les recommandations de l'ISTH (Cattaneo et al., 2013) dans l'optique que cette standardisation permette à l'avenir une meilleure comparaison des données. Nous sommes aussi attachés à

déterminer le phénotype de l'épicatechine seule. C'est pourquoi nos résultats sont à notre connaissance les seuls obtenus à partir de plasma riche en plaquettes sans ajustement de la concentration en plaquettes. Cela explique également les différences de concentrations en agonistes utilisés.

Au final, globalement, l'épicatechine semble pouvoir moduler l'agrégation plaquettaire induite par la majorité des principaux agonistes fréquemment utilisés, à partir d'une concentration de 100 μ M. Différentes hypothèses peuvent être avancées compte tenu de la multiplicité des agonistes en cause, telles qu'un impact de l'épicatechine sur la mobilisation du calcium intracellulaire, l'inhibition de l'inositol triphosphate ou la régulation de l'AMP cyclique. L'explication pourrait résider dans les propriétés antioxydantes de l'épicatechine. En effet, il a été montré que les flavonoïdes sont capables de limiter la libération plaquettaire de peroxyde d'hydrogène. Ce dernier étant capable d'activer la voie du phosphoinositol, son inhibition entraînerait une diminution de l'activation des phospholipases, de la formation d'inositol triphosphate et de la mobilisation du calcium intraplaquettaire (Pignatelli et al., 2000). D'autres estiment que l'impact sur l'agrégation plaquettaire pourrait être expliqué par une inhibition de la peroxydation lipidique (Neiva et al., 1999) ou grâce à un blocage de la production de radicaux libres (Salvemini and Botting, 1993). Schram et coll. suggèrent quant à eux que les procyanidines, en engendrant une diminution du rapport leucotriènes / prostacycline et donc une altération de la synthèse des eicosanoïdes, seraient à l'origine d'une inhibition plaquettaire par augmentation de la concentration d'AMP cyclique (Schramm et al., 2001).

Tableau 1 : Méthodologie et résultats des tests d'agrégation plaquettaire utilisés pour évaluer l'impact des flavonoïdes et de l'épicatéchine.

Auteur	Olas B. et coll.	Bijak M. et coll.	Innes AJ. et coll.	Kang WS. et coll.
Année	2011	2013	2003	2001
DOI	10.3109/09537104.2011.61856 2	10.1002/ptr.4682	10.1080/095371003100012368 1	10.1097/00005344-200112000-00009
In vitro/In vivo	In vitro	In vitro	In vivo	In vitro
Flavonoïde	Extrait de pépins de raisin	Extrait de pépins de raisin	Extrait d'Aronia melanocarpa	Thé vert
Concentration	dès 1,25 µg/mL	A partir de 0,5 µg/mL	/	Dès 0,3 mg/mL
Technique	Agrégation plaquettaire sur plaquettes lavées	Agrégation plaquettaire sur plaquettes lavées	Agrégation plaquettaire sur PRP ajusté	Agrégation plaquettaire sur plaquettes lavées
TRAP	20 mM			
Thrombine	0,1 U/mL	0,1 U/mL	0,1 U/mL	0,5 U/mL
Collagène			0,5 µg/mL	50 µg/mL
ADP			0,5 - 2,0 µM	20 µM
Calcium ionophore A23187				1 µM
Acide arachidonique				
Epinéphrine				
Concentration en agoniste plaquettaire mettant en évidence un impact des flavonoïdes				

TRAP : Thrombin Receptor Activator Peptide, ADP : Adénosine diphosphate, PRP : Plasma riche en plaquettes.

Murphy K. et coll.	Neiva TJ. et coll.	Heptinstall J. et coll.	Bijak M. et coll.	Sinegre T. et coll.
2003	1999	2006	2014	2019
10.1093/ajcn/77.6.1466	10.1002/(sici)1099-1573(199911)13:7	10.1097/00005344-200606001-00015	10.1007/s00044-013-0829-4	10.1039/c9fo00816k
In vivo	In vitro	In vitro	In vitro	In vitro
Chocolat noir	Epicatéchine	Epicatéchine	Epicatéchine	Epicatéchine
Epicatéchine 116 nM	Dès 170 µM	100 µM	100 µM et 1000 µM	100 µM
Agrégation plaquettaire sur sang total	Agrégation plaquettaire sur ajusté	Agrégation plaquettaire sur sang total	Agrégation plaquettaire sur plaquettes lavées	Agrégation plaquettaire sur PRP
2 µg/mL	0,5 µg/mL	0,125 µg/mL	0,3 U/mL	2 µg/mL
8 µM	3 µM			2 µM
1 mM	0,3 mM			1 mM
	6 µM			5 µM
Concentration en agoniste plaquettaire ne mettant pas en évidence un impact des flavonoïdes				

L'activation plaquettaire ainsi que le remodelage de la cellule permettent l'exposition de la glycoprotéine IIb-IIIa et au final l'agrégation plaquettaire. Ce processus a également pour conséquence la formation de microparticules. Celles-ci de par leur potentiel procoagulant jouent un rôle important dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires, notamment (Melki et al., 2017). Si certains régimes alimentaires ou mélanges de polyphénols semblent altérer la formation de microparticules (Ed Nignpense et al., 2019), aucune donnée n'existe spécifiquement sur l'épicatéchine. Ce fut l'objet de nos travaux où nous sommes attachés à déterminer dans un premier temps l'impact de l'épicatéchine sur la formation et la concentration en microparticules, avec une attention particulière pour les microparticules plaquettaires, y compris différentes sous-populations définies en fonction de la taille ou de certains marqueurs. Différents modèles ont été utilisés : dans le premier nous avons simplement incubé l'épicatéchine dans le plasma riche en plaquettes avec du tampon avant d'isoler les microparticules. Dans le deuxième après incubation de l'épicatéchine, nous avons stimulé un plasma riche en plaquettes avec du calcium ionophore A23187 avant de recueillir les microparticules et dans le troisième nous avons remplacé le calcium ionophore par du TRAP (Figure 24). Ces molécules ont été utilisées en raison de leur capacité à favoriser l'activation plaquettaire et l'apoptose (Gyulkhandanyan et al., 2013), tout en ayant montrées une sensibilité à l'épicatéchine lors d'études sur l'agrégation plaquettaire (Olas et al., 2012b; Sinegre et al., 2019).

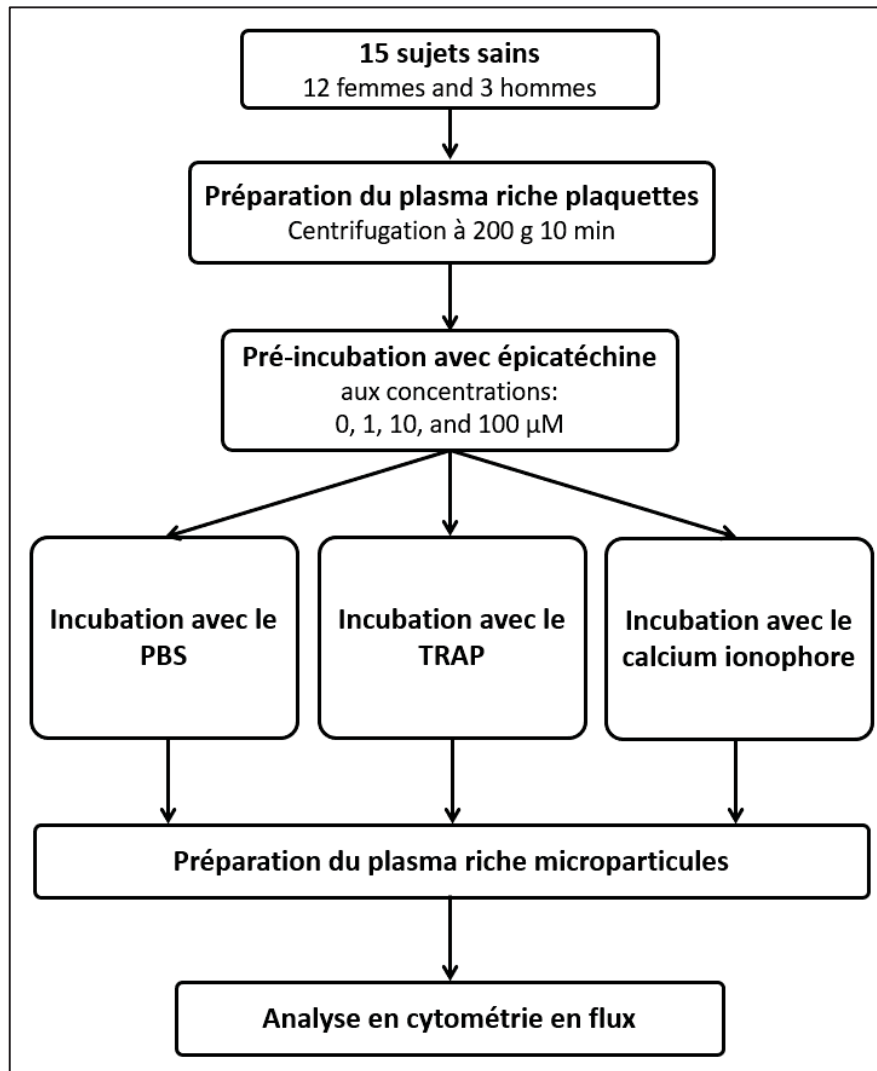


Figure 24 : Préparation des échantillons pour l’analyse des microparticules en cytométrie en flux

En ce qui concerne la concentration globale en microparticules, nous n’avons ainsi constaté aucun impact de l’épicatechine, y compris après la stimulation du plasma riche en plaquettes par le TRAP ou le calcium ionophore. Les microparticules plaquettaires (exprimant la glycoprotéine IIb) sont également stables quelles que soient les conditions. Ces résultats sont en contradiction avec les données d’Olas et coll. qui retrouvaient une diminution des microparticules plaquettaires induites par le TRAP ou la thrombine mais en travaillant *in vitro* sur les extraits de pépins de raisin (particulièrement riche en proanthocyanidines) et non sur l’épicatechine pure (Olas et al., 2012b). *In vivo*, que ce soit avec de l’avoine enrichie en polyphénols ou avec du chocolat noir plusieurs auteurs ont constaté une diminution

du nombre de microparticules plaquettaires mais avec une méthodologie différente de la nôtre (glycoprotéine ciblée, prise en compte des corps apoptotiques...) (Rein et al., 2000c; Zhang et al., 2014). A l'inverse, Horn et coll. ne retrouve pas d'impact des flavanols du chocolat noir sur les microparticules plaquettaires détectées comme nous grâce à la glycoprotéine IIb (Horn et al., 2014). Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux sous populations de microparticules plaquettaires. Suite à l'incubation avec l'épicatechine, la sous population exprimant la phosphatidylsérine, un phospholipide procoagulant, demeure stable en concentration et en intensité d'expression, y compris après stimulation plaquettaire. A l'inverse, l'épicatechine induit une diminution des microparticules exprimant la sélectine P, un marqueur d'activation plaquettaire, alors que la stimulation du plasma riche en plaquettes par le TRAP ou le calcium ionophore annihile cet effet. Enfin, les concentrations en microparticules plaquettaires exprimant conjointement les glycoprotéines IIb et Ib sont diminuées après incubation avec l'épicatechine. Là encore, la stimulation du PRP supprime cet effet. Ces données semblent montrer un impact de l'épicatechine avant stimulation intense par les agonistes, cet impact n'étant ensuite plus observable. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées et notamment un effet de l'épicatechine non lié à une interférence dans le processus d'activation cellulaire. A noter que cet effet n'était plus retrouvé après une forte stimulation plaquettaire induisant une multiplication de la concentration en microparticules d'un facteur 2 ou 10 selon l'agoniste. Au final, l'utilisation d'agonistes plaquettaires pouvant engendrer une stimulation non appropriée des plaquettes, l'étude de l'impact spécifique de l'épicatechine sur la formation de microparticules mérite donc d'être approfondi par des expérimentations *in vivo* chez des sujets sains, à risque, et atteints de maladies cardiovasculaires.

L'impact de l'épicatechine a également été étudié quant à sa capacité à moduler l'effet procoagulant des microparticules, et cela, grâce à trois techniques différentes. Tout d'abord, nous avons adapté une technique de génération de thrombine sur le CAT dans laquelle le plasma riche en microparticules incubé avec l'épicatechine constituait la source de phospholipides et de facteur tissulaire. Par ailleurs la coagulation n'était déclenchée que par ce dernier, les prélèvements ayant été réalisés avec du corn trypsin inhibitor dans le tube, composé capable d'inhiber l'activation de la phase contact (Hansson et al., 2014). La génération de

thrombine présentait dans ces conditions un profil particulier, avec une phase d'initiation retardée et une absence de pic de thrombine qui était remplacé par un long plateau. Plusieurs études ont pu montrer que l'initiation de la génération de thrombine était principalement supportée par les microparticules monocytaires et non par les microparticules plaquettaires (Aleman et al., 2011; Berckmans et al., 2001). Ces dernières supporteraient la phase de propagation de la génération de thrombine et contribueraient aux activités prothrombotiques après la phase d'initiation (Macey et al., 2011). L'épicatéchine a néanmoins montré à forte concentration (100 μ M) la capacité d'inhiber discrètement le potentiel endogène de thrombine porté par les microparticules (Sinegre et al., 2020). Afin de déterminer la cible de l'épicatéchine (potentiellement les phospholipides procoagulants ou le facteur tissulaire), nous avons étudié spécifiquement ces deux aspects.

Le test Zymuphen™ MP-TF n'a pas montré d'effet *in vitro* de l'épicatéchine sur la concentration en microparticules exprimant le facteur tissulaire. Zhang et coll. avaient cependant montré *ex vivo* qu'une consommation d'avoine riche en polyphénols diminuait la formation de microparticules monocytaires, exprimant le facteur tissulaire (Zhang et al., 2014). Nos données se rapprochent néanmoins de celles de Horn et coll. qui ont montré *ex vivo* une absence d'effet d'une consommation en chocolat noir enrichi en flavanols sur le rôle procoagulant des microparticules médié par le facteur tissulaire, via une technique analogue à la nôtre (Horn et al., 2014). L'étude de l'impact de l'épicatéchine sur les microparticules dont le rôle procoagulant est médié par les phospholipides (phosphatidylsérine) a été réalisée avec le test Zymuphen™ MP activité. Ce test a pu montrer, après capture des microparticules grâce à l'annexine V et révélation grâce à la formation de thrombine clivant secondairement un substrat chromogénique, une diminution de l'activité procoagulante. Ces données sont en contradiction avec nos résultats obtenus par cytométrie en flux qui ne mettaient pas en évidence d'impact de l'épicatéchine sur l'expression de la phosphatidylsérine par les microparticules plaquettaires. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces discordances telles que les différences de méthodologie, la cytométrie en flux ne s'intéressant qu'à la quantification des microparticules et non à leurs capacités fonctionnelles. Une inhibition directe a également pu impacter l'étape de révélation par la thrombine du test Zymuphen™ comme celle du test de

génération de thrombine (M. Bijak et al., 2014b; Sinegre et al., 2019). Ces travaux doivent être explorés plus avant, y compris *in vivo*, afin de déterminer le rôle propre de l'épicatéchine sur le potentiel procoagulant des microparticules.

Si les microparticules sont impliquées dans le processus de coagulation, ce dernier allie également de manière complexe des activations enzymatiques en cascade supportées par une composante phospholipidique cellulaire (Hoffman, 2003; Smith, 2009). L'objectif final du processus est de générer de manière localisée une quantité importante de thrombine qui sera à l'origine de la transformation du fibrinogène en caillot de fibrine. Afin de déterminer l'impact de l'épicatéchine sur la coagulation plasmatique, nous avons utilisé le test de génération de thrombine qui représente l'approche la plus fidèle au processus tel qu'il se déroule *in vivo* en tenant notamment compte de la majorité des facteurs procoagulants et anticoagulants (Hemker and Béguin, 2000). Nos résultats mettent en évidence un impact de l'épicatéchine sur la génération de thrombine réalisée sur plasma pauvre en plaquettes ainsi que sur plasma riche en plaquettes bien qu'à un degré moindre. La première technique sur plasma pauvre en plaquettes nécessite l'ajout de facteur tissulaire (1 pM) pour déclencher le processus de coagulation et de phospholipides procoagulants pour mimer la surface phospholipide des cellules et notamment des plaquettes, qui servent de support aux réactions enzymatiques. Dans la seconde, seul le facteur tissulaire (1 pM) est apporté par les réactifs, les plaquettes des sujets jouant ce rôle de support. Les données disponibles dans la littérature sont, à notre connaissance, peu nombreuses en ce qui concerne l'impact propre de l'épicatéchine sur le processus de coagulation. Seuls Von Känel et coll. ont pu mettre en évidence *ex vivo* une corrélation entre une concentration en D-dimères diminuée et des taux plasmatiques en épicatéchine élevés suite à la consommation de chocolat noir riche en épicatéchine (von Känel et al., 2014). Compte tenu des capacités des polyphénols à inhiber les protéases à sérine (Massimiliano Cuccioloni et al., 2009) les investigations, *in vitro*, se sont portées quasi exclusivement sur la thrombine. Une seule étude s'est intéressée au facteur X activé, montrant une inhibition de son activité amidolytique par la procyanidine B2, un dimère d'épicatéchine, potentiellement par encombrement de son site actif (Michal Bijak et al., 2014). En ce qui concerne la thrombine, d'un point de vue structural, et sur la base des expériences de *docking* il semble que l'épicatéchine pourrait interférer au niveau du site actif de l'enzyme. Il apparaît néanmoins que l'épicatéchine ne

fait pas partie des flavonoïdes ayant la plus forte affinité pour le site actif, sa constante de dissociation demeurant élevée (Bijak et al., 2016; M. Bijak et al., 2014b; Massimiliano Cuccioloni et al., 2009; Li et al., 2018; Mozzicafreddo et al., 2006). Ces données rendent difficilement exploitables les expérimentations réalisées sur les mélanges de flavonoïdes présents dans les extraits végétaux (Bijak et al., 2011; Sikora et al., 2014). Enfin, la technique de génération de thrombine sur le CAT est caractérisée par un manque de standardisation qui a amené le développement récent d'une technique automatisée sur un nouvel équipement, le ST-Genesisia. Nous avons ainsi entrepris d'essayer de confirmer ces résultats et de les approfondir en répétant sur un nombre restreint de patients ces expérimentations sur le ST-Genesisia, avec une concentration en facteur tissulaire de 5 pM et en intégrant la thrombomoduline. A cette concentration, aussi bien sur le CAT que sur le ST-Genesisia, nous ne retrouvons pas d'impact de l'épicatéchine, quelle que soit sa concentration, sur la génération de thrombine, avec un ETP allant (moyenne \pm écart-type) de 1506 \pm 274 nM.min pour le véhicule à 1428 \pm 311 nM.min pour l'épicatéchine 100 μ M ($p = 0,15$). De la même manière, l'utilisation de thrombomoduline pour sensibiliser le processus au système inhibiteur de la protéine C / protéine S ne montrait pas d'impact de l'épicatéchine, avec un ETP allant de 872 \pm 159 nM.min pour le véhicule à 848 \pm 160 nM.min pour l'épicatéchine 100 μ M ($p = 0,34$) (Figure 25). Ces données (non encore publiées) qui devront être enrichies et confirmées sur un effectif plus important révèlent l'importance de la méthodologie pour évaluer la génération de thrombine. D'une part, les concentrations des différents réactifs et notamment celle du facteur tissulaire peuvent varier. Les concentrations relativement faibles sensibilisent le test à la phase d'amplification et sont classiquement utilisées dans les maladies hémorragiques liées notamment à un défaut touchant la voie intrinsèque telles que les hémophilies. Les concentrations intermédiaires en facteur tissulaire quant à elles sont préférentiellement utilisées pour détecter une anomalie d'ordre thrombotique, avec notamment l'ajout de thrombomoduline. Ces données suggèrent que l'épicatéchine pourrait impacter la phase d'amplification ou bien un manque global de sensibilité du test de génération de thrombine lorsqu'il est initié par de fortes concentrations de facteur tissulaire. D'autre part, le ST-Genesisia, automate de dernière génération, présente l'avantage d'une automatisation complète. Cette dernière permet de diminuer les erreurs techniques et un contrôle étroit de la température limite la variabilité. Il utilise un plasma de référence dédié

(De Smedt and Hemker, 2011) ainsi qu'une étape spécifique de calibration de l'automate. Autant de précautions qui permettent de limiter la variabilité de mesures et pouvant expliquer des résultats différents. Il conviendra également d'évaluer l'impact d'une exposition *in vivo* au long cours à l'épicatéchine.

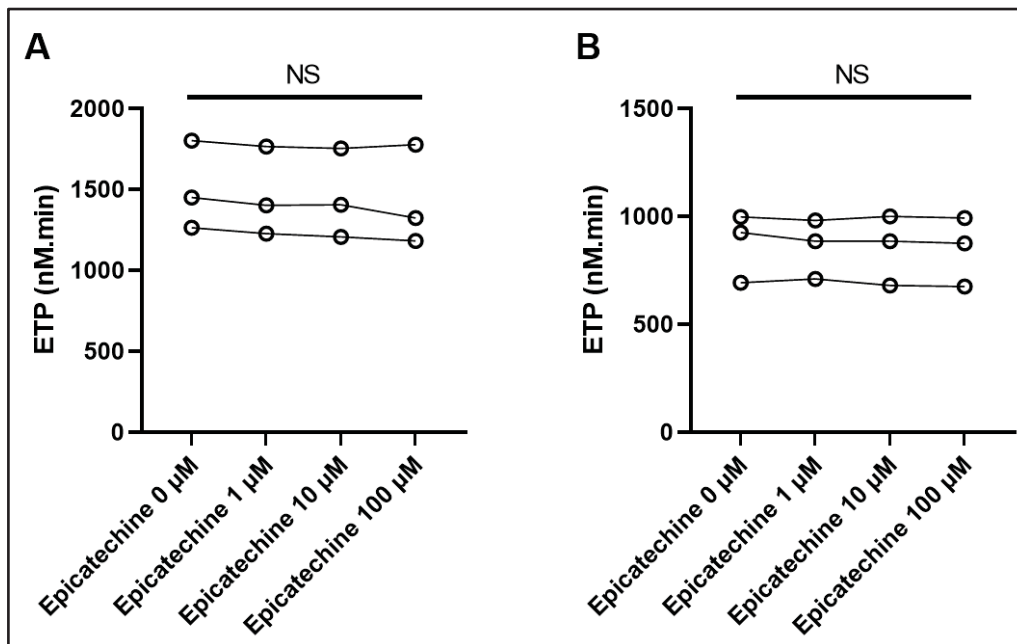


Figure 25 : Impact de l'épicatéchine sur la génération de thrombine réalisée sur ST-Genesis.

- A. Potentiel endogène de thrombine en absence de thrombomoduline.
 B. Potentiel endogène de thrombine en présence de thrombomoduline.
 NS : Non significatif

Le processus de coagulation se finalise sous l'action de la thrombine par la formation des fibres de fibrine qui constituent le caillot de fibrine (Mihalko and Brown, 2020). Les propriétés structurales et fonctionnelles du caillot jouent un rôle essentiel dans la physiologie de l'hémostase et sont altérées dans les pathologies thrombotiques (Baker et al., 2019; Bridge et al., 2014; Karpińska et al., 2020; Mills et al., 2002; Sumaya et al., 2018; Undas et al., 2011). Une modification de la densité du caillot avec une faible perméabilité peut entraîner une résistance à la lyse (Cieslik et al., 2018; Siudut et al., 2016; Undas et al., 2009). Compte tenu des données montrant la capacité des flavonoïdes à interagir avec la thrombine nous avons entrepris de déterminer si l'épicatéchine pouvait interférer dans le processus de fibrinogenèse (Sinégre et al., 2021). L'analyse structurale montre un impact de l'épicatéchine (seulement à la concentration « intermédiaire » de 10 µM) sur l'augmentation du rayon des fibres de fibrine et sur l'espace entre ces fibres. Bien que statistiquement significatifs, ces résultats montrent un effet discret sur ces paramètres, bien inférieur par exemple à ceux observés avec un véritable

traitement anticoagulant. L'impact sur le rayon des fibres est néanmoins confirmé par microscopie électronique qui montre une augmentation jusqu'à la concentration 10 μM d'épicatéchine puis, étonnamment, une diminution du rayon à 100 μM . Nous avons essayé de confirmer ces résultats en utilisant la batroxobine qui lie le fibrinogène d'une manière différente de la thrombine sans toutefois retrouver un impact de l'épicatéchine dans ces conditions analytiques. Les hypothèses quant à ces résultats différents peuvent résider dans une affinité plus élevée du fibrinogène pour la thrombine qui masquerait l'effet de l'épicatéchine ou dans la libération sélective du fibrinopeptide A (Vu et al., 2013). Ces modifications structurales induites par l'épicatéchine semblent engendrer, d'un point de vue fonctionnel, un impact sur la perméabilité du caillot de fibrine avec une augmentation de la porosité, seulement à 10 μM d'épicatéchine. Une augmentation de la porosité suggèrent une sensibilité du caillot accrue à la lyse (Undas, 2020, 2016). La modulation de la structure et des propriétés du caillot par l'épicatéchine est susceptible d'interférer avec le processus fibrinolytique. Nous avons donc entrepris de déterminer l'impact de l'épicatéchine sur la fibrinolyse. Compte tenu des données de la littérature qui révélaient un rôle parfois antagoniste (profibrinolytique ou antifibrinolytique) sur les différents facteurs du processus, nous avons utilisé un test global. La mesure du temps de lyse du caillot a permis d'étudier la majorité des activateurs et des inhibiteurs de la fibrinolyse et au final d'apprécier le retentissement global de l'épicatéchine sur la capacité de la plasmine à lyser le caillot. Nos données structurales qui montraient des fibres plus épaisses et un espace plus large entre ces fibres et celles fonctionnelles avec une perméabilité augmentée laissaient supposer une sensibilité accrue du caillot à la lyse, notamment du fait d'une meilleure accessibilité de la plasmine. Nos résultats ont mis en évidence que le temps de lyse du caillot était raccourci en présence d'épicatéchine. Néanmoins, nos résultats ne permettent pas de savoir si cela provient de la modification seule du caillot ou d'un rôle direct sur les facteurs de la fibrinolyse. Par ailleurs, ces données sur sujets sains doivent être confirmées sur des caillots issus de patients présentant un état prothrombotique après supplémentation par l'épicatéchine *in vitro* et lors d'une étude *in vivo*.

En conclusion, au sein des régimes alimentaires bénéfiques à la santé et parmi les nombreux flavonoïdes présents dans ces aliments, l'épicatéchine présente des propriétés intéressantes aussi bien antioxydantes et anti-inflammatoires que sur le versant de l'hémostase. Nos résultats ouvrent des perspectives et plusieurs questions restent en suspens. Il est dès lors important de déterminer si l'épicatéchine exerce les mêmes effets sur les sujets présentant un état prothrombotique. Couplée à des tests globaux, une étude *in vivo* donnerait également la double opportunité de tester l'impact des métabolites circulants de l'épicatéchine (dérivés glucuronides, sulfates et méthyls) ainsi que l'effet d'une exposition longue à des concentrations compatibles avec une consommation d'aliments traditionnellement riches ou enrichis en épicatéchine.

REFERENCES

- Abou-Agag, L.H., Aikens, M.L., Tabengwa, E.M., Benza, R.L., Shows, S.R., Grenett, H.E., Booyse, F.M., 2001. Polyphenolics increase t-PA and u-PA gene transcription in cultured human endothelial cells. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25, 155–162.
- Actis-Goretta, L., Lévêques, A., Giuffrida, F., Romanov-Michailidis, F., Viton, F., Barron, D., Duenas-Paton, M., Gonzalez-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Williamson, G., Dionisi, F., 2012. Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radic Biol Med* 53, 787–795.
- Ahmad, S.S., London, F.S., Walsh, P.N., 2003. The assembly of the factor X-activating complex on activated human platelets. *J. Thromb. Haemost.* 1, 48–59.
- Aird, W.C., 2015. Endothelium and haemostasis. *Hamostaseologie* 35, 11–16.
- Ajjan, R., Grant, P.J., 2006. Coagulation and atherothrombotic disease. *Atherosclerosis* 186, 240–259.
- Aleman, M.M., Gardiner, C., Harrison, P., Wolberg, A.S., 2011. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability. *J. Thromb. Haemost.* 9, 2251–2261.
- Alessi, M.-C., Sié, P., Payrastre, B., 2020. Strengths and Weaknesses of Light Transmission Aggregometry in Diagnosing Hereditary Platelet Function Disorders. *Journal of Clinical Medicine* 9.
- Allman-Farinelli, M.A., Dawson, B., 2005. Diet and aging: bearing on thrombosis and hemostasis. *Semin. Thromb. Hemost.* 31, 111–117.
- Almatroodi, S.A., Almatroudi, A., Khan, A.A., Alhumaydhi, F.A., Alsahli, M.A., Rahmani, A.H., 2020. Potential Therapeutic Targets of Epigallocatechin Gallate (EGCG), the Most Abundant Catechin in Green Tea, and Its Role in the Therapy of Various Types of Cancer. *Molecules* 25.
- Andre, P., Delaney, S.M., LaRocca, T., Vincent, D., DeGuzman, F., Jurek, M., Koller, B., Phillips, D.R., Conley, P.B., 2003. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J. Clin. Invest.* 112, 398–406.
- Angles-Cano, E., Balaton, A., Le Bonniec, B., Genot, E., Elion, J., Sultan, Y., 1985. Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue-type

plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. *Blood* 66, 913–920.

Aoki, N., 2005. The past, present and future of plasmin inhibitor. *Thromb. Res.* 116, 455–464.

Aron, P.M., Kennedy, J.A., 2008. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol Nutr Food Res* 52, 79–104.

Arts, I.C.W., Hollman, P.C.H., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 317S–325S.

Badimon, L., Suades, R., Crespo, J., Padro, T., Chiva-Blanch, G., 2018. Diet, microparticles and atherothrombosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 23, 432–457.

Baglin, T., 2005. The measurement and application of thrombin generation. *Br. J. Haematol.* 130, 653–661.

Baglin, T., Gray, E., Greaves, M., Hunt, B.J., Keeling, D., Machin, S., Mackie, I., Makris, M., Nokes, T., Perry, D., Tait, R.C., Walker, I., Watson, H., British Committee for Standards in Haematology, 2010. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Br. J. Haematol.* 149, 209–220.

Bagoly, Z., Koncz, Z., Hársfalvi, J., Muszbek, L., 2012. Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb. Res.* 129, 382–387.

Bahia, P.K., Rattray, M., Williams, R.J., 2008. Dietary flavonoid (-)epicatechin stimulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent anti-oxidant response element activity and up-regulates glutathione in cortical astrocytes. *J Neurochem* 106, 2194–2204.

Bajzar, L., Manuel, R., Nesheim, M.E., 1995. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J. Biol. Chem.* 270, 14477–14484.

Baker, S.R., Zabczyk, M., Macrae, F.L., Duval, C., Undas, A., Ariëns, R.A.S., 2019. Recurrent venous thromboembolism patients form clots with lower elastic modulus than those formed by patients with non-recurrent disease. *J. Thromb. Haemost.* 17, 618–626.

Banfi, C., Brioschi, M., Wait, R., Begum, S., Gianazza, E., Pirillo, A., Mussoni, L., Tremoli, E., 2005. Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *Proteomics* 5, 4443–4455.

- Beaudoin, A.R., Grondin, G., 1991. Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena. *Biochim Biophys Acta* 1071, 203–219.
- Behnke, O., Forer, A., 1998. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl* 61, 3–23.
- Bennett, J.S., 2001. Platelet-fibrinogen interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 340–354.
- Berckmans, R.J., Nieuwland, R., Böing, A.N., Romijn, F.P., Hack, C.E., Sturk, A., 2001. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb. Haemost.* 85, 639–646.
- Bernatova, I., 2018. Biological activities of (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. *Biotechnol Adv* 36, 666–681.
- Bettaieb, A., Vazquez Prieto, M.A., Rodriguez Lanzi, C., Miatello, R.M., Haj, F.G., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2014. (-)-Epicatechin mitigates high fructose-associated insulin resistance by modulating redox signaling and endoplasmic reticulum stress. *Free Radic Biol Med* 72, 247–256.
- Bijak, M., Bobrowski, M., Borowiecka, M., Podsędek, A., Golański, J., Nowak, P., 2011. Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia* 82, 811–817.
- Bijak, M., Nowak, P., Borowiecka, M., Ponczek, M.B., Żbikowska, H.M., Wachowicz, B., 2012. Protective effects of (-)-epicatechin against nitrative modifications of fibrinogen. *Thromb. Res.* 130, e123-128.
- Bijak, Michal, Ponczek, M.B., Nowak, P., 2014. Polyphenol compounds belonging to flavonoids inhibit activity of coagulation factor X. *Int J Biol Macromol* 65, 129–135.
- Bijak, M., Saluk, J., Ponczek, M.B., Nowak, P., 2013. Antithrombin effect of polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Phytother Res* 27, 71–76.
- Bijak, M., Saluk, J., Szelenberger, R., Nowak, P., 2016. Popular naturally occurring antioxidants as potential anticoagulant drugs. *Chem. Biol. Interact.* 257, 35–45.

- Bijak, M., Ziewiecki, R., Saluk, J., Ponczek, M., Pawlaczyk, I., Krotkiewski, H., Wachowicz, B., Nowak, P., 2014a. Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds. *Med Chem Res* 23, 2324–2337.
- Bijak, M., Ziewiecki, R., Saluk, J., Ponczek, M., Pawlaczyk, I., Krotkiewski, H., Wachowicz, B., Nowak, P., 2014b. Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds. *Med Chem Res* 23, 2324–2337.
- Binder, B.R., Christ, G., Gruber, F., Grubic, N., Hufnagl, P., Krebs, M., Mihaly, J., Prager, G.W., 2002. Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol. Sci.* 17, 56–61.
- Björkqvist, J., Nickel, K.F., Stavrou, E., Renné, T., 2014. In vivo activation and functions of the protease factor XII. *Thromb. Haemost.* 112, 868–875.
- Boender, J., Kruij, M.J.H.A., Leebeek, F.W.G., 2016. A diagnostic approach to mild bleeding disorders. *J. Thromb. Haemost.* 14, 1507–1516.
- Bondonno, N.P., Dalgaard, F., Kyrø, C., Murray, K., Bondonno, C.P., Lewis, J.R., Croft, K.D., Gislason, G., Scalbert, A., Cassidy, A., Tjønneland, A., Overvad, K., Hodgson, J.M., 2019. Flavonoid intake is associated with lower mortality in the Danish Diet Cancer and Health Cohort. *Nat Commun* 10, 3651.
- Bonnefoy, A., Romijn, R.A., Vandervoort, P. a. H., VAN Rompaey, I., Vermylen, J., Hoylaerts, M.F., 2006. von Willebrand factor A1 domain can adequately substitute for A3 domain in recruitment of flowing platelets to collagen. *J. Thromb. Haemost.* 4, 2151–2161.
- Bordeaux, B., Yanek, L.R., Moy, T.F., White, L.W., Becker, L.C., Faraday, N., Becker, D.M., 2007. Casual chocolate consumption and inhibition of platelet function. *Prev Cardiol* 10, 175–180.
- Borges, G., Ottaviani, J.I., van der Hooft, J.J.J., Schroeter, H., Crozier, A., 2018. Absorption, metabolism, distribution and excretion of (-)-epicatechin: A review of recent findings. *Mol. Aspects Med.* 61, 18–30.
- Boulanger, C.M., Amabile, N., Tedgui, A., 2006. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 48, 180–186.
- Braune, S., Küpper, J.-H., Jung, F., 2020. Effect of Prostanoids on Human Platelet Function: An Overview. *Int J Mol Sci* 21.

- Bridge, K.I., Philippou, H., Ariëns, R.A.S., 2014. Clot properties and cardiovascular disease. *Thromb. Haemost.* 112, 901–908.
- Brisson, A.R., Tan, S., Linares, R., Gounou, C., Arraud, N., 2017. Extracellular vesicles from activated platelets: a semiquantitative cryo-electron microscopy and immuno-gold labeling study. *Platelets* 28, 263–271.
- Bryckaert, M., Rosa, J.-P., Denis, C.V., Lenting, P.J., 2015. Of von Willebrand factor and platelets. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 307–326.
- Bye, A.P., Unsworth, A.J., Gibbins, J.M., 2016. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J Thromb Haemost* 14, 918–930.
- Carnevale, R., Loffredo, L., Pignatelli, P., Nocella, C., Bartimoccia, S., Di Santo, S., Martino, F., Catasca, E., Perri, L., Violi, F., 2012. Dark chocolate inhibits platelet isoprostanes via NOX2 down-regulation in smokers. *J. Thromb. Haemost.* 10, 125–132.
- Carpenter, S.L., Mathew, P., 2008. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia* 14, 1250–1254.
- Carrieri, C., Galasso, R., Semeraro, F., Ammollo, C.T., Semeraro, N., Colucci, M., 2011. The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and factor XI in platelet-mediated fibrinolysis resistance: a thromboelastographic study in whole blood. *J Thromb Haemost* 9, 154–162.
- Carrieri, C., Milella, R.A., Incampo, F., Crupi, P., Antonacci, D., Semeraro, N., Colucci, M., 2013. Antithrombotic activity of 12 table grape varieties. Relationship with polyphenolic profile. *Food Chem* 140, 647–653.
- Cattaneo, M., 2015. P2Y₁₂ receptors: structure and function. *J Thromb Haemost* 13 Suppl 1, S10-16.
- Cattaneo, M., 2009. Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. *Semin. Thromb. Hemost.* 35, 158–167.
- Cattaneo, M., Cerletti, C., Harrison, P., Hayward, C.P.M., Kenny, D., Nugent, D., Nurden, P., Rao, A.K., Schmaier, A.H., Watson, S.P., Lussana, F., Pugliano, M.T., Michelson, A.D., 2013. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J. Thromb. Haemost.*

- Cesar, P.H.S., Trento, M.V.C., Konig, I.F.M., Marcussi, S., 2020. Catechin and epicatechin as an adjuvant in the therapy of hemostasis disorders induced by snake venoms. *J Biochem Mol Toxicol* 34, e22604.
- Cesarman-Maus, G., Hajjar, K.A., 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* 129, 307–321.
- Chitlur, M., Sorensen, B., Rivard, G.E., Young, G., Ingerslev, J., Othman, M., Nugent, D., Kenet, G., Escobar, M., Lusher, J., 2011. Standardization of thromboelastography: a report from the TEG-ROTEM working group. *Haemophilia* 17, 532–537.
- Choi, J.-H., Kim, D.-W., Park, S.-E., Lee, H.-J., Kim, K.-M., Kim, K.-J., Kim, M.-K., Kim, S.-J., Kim, S., 2015a. Anti-thrombotic effect of rutin isolated from *Dendropanax morbifera* Leveille. *J. Biosci. Bioeng.* 120, 181–186.
- Choi, J.-H., Kim, Y.-S., Shin, C.-H., Lee, H.-J., Kim, S., 2015b. Antithrombotic Activities of Luteolin In Vitro and In Vivo. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 29, 552–558.
- Choi, J.-H., Park, S.-E., Kim, S.-J., Kim, S., 2015c. Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. *Biochimie* 115, 177–186.
- Chua, T.K., Koh, H.L., 2006. Medicinal plants as potential sources of lead compounds with anti-platelet and anti-coagulant activities. *Mini Rev Med Chem* 6, 611–624.
- Cieslik, J., Mrozinska, S., Broniatowska, E., Undas, A., 2018. Altered plasma clot properties increase the risk of recurrent deep vein thrombosis: a cohort study. *Blood* 131, 797–807.
- Clifford, M.N., van der Hooft, J.J.J., Crozier, A., 2013. Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. *Am J Clin Nutr* 98, 1619S-1630S.
- Coenen, D.M., Mastenbroek, T.G., Cosemans, J.M.E.M., 2017. Platelet interaction with activated endothelium: mechanistic insights from microfluidics. *Blood* 130, 2819–2828.
- Cohen, A., 1997. *Cardiologie et pathologie vasculaire*. Ed. ESTEM, Paris.
- Cointe, S., Judicone, C., Robert, S., Mooberry, M.J., Poncelet, P., Wauben, M., Nieuwland, R., Key, N.S., Dignat-George, F., Lacroix, R., 2017. Standardization of

microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. *J Thromb Haemost* 15, 187–193.

Collen, D., 1980. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb. Haemost.* 43, 77–89.

Coller, B.S., Shattil, S.J., 2008. The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIb beta3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood* 112, 3011–3025.

Conard, J., Brosstad, F., Lie Larsen, M., Samama, M., Abildgaard, U., 1983. Molar antithrombin concentration in normal human plasma. *Haemostasis* 13, 363–368.

Correa, F., Gauberti, M., Parcq, J., Macrez, R., Hommet, Y., Obiang, P., Hernangómez, M., Montagne, A., Liot, G., Guaza, C., Maubert, E., Ali, C., Vivien, D., Docagne, F., 2011. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med* 208, 1229–1242.

Coughlin, S.R., 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 3, 1800–1814.

Crandall, D.L., Quinet, E.M., Morgan, G.A., Busler, D.E., McHendry-Rinde, B., Kral, J.G., 1999. Synthesis and secretion of plasminogen activator inhibitor-1 by human preadipocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 3222–3227.

Crozier, A., Del Rio, D., Clifford, M.N., 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Aspects Med* 31, 446–467.

Cuccioloni, Massimiliano, Mozzicafreddo, M., Bonfili, L., Cecarini, V., Eleuteri, A.M., Angeletti, M., 2009. Natural Occurring Polyphenols as Template for Drug Design. Focus on Serine Proteases. *Chemical Biology & Drug Design* 74, 1–15.

Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Sparapani, L., Spina, M., Eleuteri, A.M., Fioretti, E., Angeletti, M., 2009. Pomegranate fruit components modulate human thrombin. *Fitoterapia* 80, 301–305.

Dahlbäck, B., 2018. Vitamin K-Dependent Protein S: Beyond the Protein C Pathway. *Semin. Thromb. Hemost.* 44, 176–184.

Davie, E.W., Kulman, J.D., 2006. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.* 32 Suppl 1, 3–15.

De Jong, A., Eikenboom, J., 2016. Developments in the diagnostic procedures for von Willebrand disease. *J. Thromb. Haemost.* 14, 449–460.

de Pascual-Teresa, S., Moreno, D.A., García-Viguera, C., 2010. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int J Mol Sci* 11, 1679–1703.

De Smedt, E., Hemker, H.C., 2011. Thrombin generation is extremely sensitive to preheating conditions. *J Thromb Haemost* 9, 233–234.

Dean, W.L., Lee, M.J., Cummins, T.D., Schultz, D.J., Powell, D.W., 2009. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb. Haemost.* 102, 711–718.

Declerck, P.J., De Mol, M., Alessi, M.C., Baudner, S., Pâques, E.P., Preissner, K.T., Müller-Berghaus, G., Collen, D., 1988. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin). *J. Biol. Chem.* 263, 15454–15461.

Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., Restani, P., 2021. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients* 13.

Di Stasio, E., De Cristofaro, R., 2010. The effect of shear stress on protein conformation: Physical forces operating on biochemical systems: The case of von Willebrand factor. *Biophys. Chem.* 153, 1–8.

Diamant, M., Tushuizen, M.E., Sturk, A., Nieuwland, R., 2004. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur. J. Clin. Invest.* 34, 392–401.

Didiasova, M., Wujak, L., Schaefer, L., Wygrecka, M., 2018. Factor XII in coagulation, inflammation and beyond. *Cell. Signal.* 51, 257–265.

Dignat-George, F., Boulanger, C.M., 2011. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 27–33.

Dovizio, M., Bruno, A., Contursi, A., Grande, R., Patrignani, P., 2018. Platelets and extracellular vesicles in cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Cancer Metastasis Rev.* 37, 455–467.

Dower, J.I., Geleijnse, J.M., Hollman, P.C., Soedamah-Muthu, S.S., Kromhout, D., 2016a. Dietary epicatechin intake and 25-y risk of cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* 104, 58–64.

Dower, J.I., Geleijnse, J.M., Kroon, P.A., Philo, M., Mensink, M., Kromhout, D., Hollman, P.C.H., 2016b. Does epicatechin contribute to the acute vascular function effects of dark chocolate? A randomized, crossover study. *Mol Nutr Food Res* 60, 2379–2386.

Dragovic, R.A., Gardiner, C., Brooks, A.S., Tannetta, D.S., Ferguson, D.J.P., Hole, P., Carr, B., Redman, C.W.G., Harris, A.L., Dobson, P.J., Harrison, P., Sargent, I.L., 2011. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* 7, 780–788.

Ed Nignpense, B., Chinkwo, K.A., Blanchard, C.L., Santhakumar, A.B., 2019. Polyphenols: Modulators of Platelet Function and Platelet Microparticle Generation? *Int J Mol Sci* 21.

Emsley, J., McEwan, P.A., Gailani, D., 2010. Structure and function of factor XI. *Blood* 115, 2569–2577.

Engler, M.B., Engler, M.M., Chen, C.Y., Malloy, M.J., Browne, A., Chiu, E.Y., Kwak, H.-K., Milbury, P., Paul, S.M., Blumberg, J., Mietus-Snyder, M.L., 2004. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 23, 197–204.

Ensor, J., Riley, R.D., Moore, D., Snell, K.I.E., Bayliss, S., Fitzmaurice, D., 2016. Systematic review of prognostic models for recurrent venous thromboembolism (VTE) post-treatment of first unprovoked VTE. *BMJ Open* 6, e011190.

Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A.J., Paquot, N., 2014. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 105, 141–150.

Fang, H., Wang, L., Wang, H., 2007. The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb. Res.* 119, 1–13.

Foley, J.H., Kim, P.Y., Mutch, N.J., Gils, A., 2013. Insights into thrombin activatable fibrinolysis inhibitor function and regulation. *J. Thromb. Haemost.* 11 Suppl 1, 306–315.

Forsgren, M., Råden, B., Israelsson, M., Larsson, K., Hedén, L.O., 1987. Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *FEBS Lett.* 213, 254–260.

Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2011. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 51, 813–823.

Fraga, C.G., Oteiza, P.I., Galleano, M., 2018. Plant bioactives and redox signaling: (-)-Epicatechin as a paradigm. *Mol Aspects Med* 61, 31–40.

Furie, B., Bouchard, B.A., Furie, B.C., 1999. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 93, 1798–1808.

Furie, B., Furie, B.C., 2007. In vivo thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* 5 Suppl 1, 12–17.

Fuster, V., Moreno, P.R., Fayad, Z.A., Corti, R., Badimon, J.J., 2005. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 937–954.

Gailani, D., Geng, Y., Verhamme, I., Sun, M., Bajaj, S.P., Messer, A., Emsley, J., 2014. The mechanism underlying activation of factor IX by factor XIa. *Thromb. Res.* 133 Suppl 1, S48-51.

Gajsiewicz, J.M., Morrissey, J.H., 2015. Structure-Function Relationship of the Interaction between Tissue Factor and Factor VIIa. *Semin. Thromb. Hemost.* 41, 682–690.

Gall, L.S., Brohi, K., Davenport, R.A., 2017. Diagnosis and Treatment of Hyperfibrinolysis in Trauma (A European Perspective). *Semin Thromb Hemost* 43, 224–234.

Garcia, D., Akl, E.A., Carr, R., Kearon, C., 2013. Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: a systematic review. *Blood* 122, 817–824.

Gasper, A., Hollands, W., Casgrain, A., Saha, S., Teucher, B., Dainty, J.R., Venema, D.P., Hollman, P.C., Rein, M.J., Nelson, R., Williamson, G., Kroon, P.A., 2014. Consumption of both low and high (-)-epicatechin apple puree attenuates platelet reactivity and increases plasma concentrations of nitric oxide metabolites: a randomized controlled trial. *Arch. Biochem. Biophys.* 559, 29–37.

GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 385, 117–171.

GBD 2015 Risk Factors Collaborators, 2016. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388, 1659–1724.

Gheldof, D., Mullier, F., Bailly, N., Devalet, B., Dogné, J.-M., Chatelain, B., Chatelain, C., 2014. Microparticle bearing tissue factor: a link between promyelocytic cells and hypercoagulable state. *Thromb Res* 133, 433–439.

Ghoshal, K., Bhattacharyya, M., 2014. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *ScientificWorldJournal* 2014.

Gibbins, J.M., 2004. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* 117, 3415–3425.

Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, 2020. *Lancet* 396, 1204–1222.

Golebiewska, E.M., Poole, A.W., 2015. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 29, 153–162.

Graf, B.A., Milbury, P.E., Blumberg, J.B., 2005. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J Med Food* 8, 281–290.

Grao-Cruces, E., Varela, L.M., Martin, M.E., Bermudez, B., Montserrat-de la Paz, S., 2021. High-Density Lipoproteins and Mediterranean Diet: A Systematic Review. *Nutrients* 13, 15.

Gremmel, T., Frelinger, A.L., Michelson, A.D., 2016. Platelet Physiology. *Semin. Thromb. Hemost.* 42, 191–204.

Gresele, P., Falcinelli, E., Bury, L., 2016. Inherited platelet function disorders. Diagnostic approach and management. *Hamostaseologie* 36, 265–278.

Gresele, P., Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on Thrombosis and Hemostasis, 2015. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 13, 314–322.

Griffin, J.H., Fernández, J.A., Gale, A.J., Mosnier, L.O., 2007. Activated protein C. *J. Thromb. Haemost.* 5 Suppl 1, 73–80.

Grotewold, E. (Ed.), 2008. *The Science of flavonoids*. Springer, New York, NY.

Grover, S.P., Mackman, N., 2019. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39, 331–338.

Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R.L., 2004. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr* 134, 613–617.

Gyulkhandanyan, A.V., Mutlu, A., Freedman, J., Leytin, V., 2013. Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *Br. J. Haematol.* 161, 245–254.

Haemmerle, M., Stone, R.L., Menter, D.G., Afshar-Kharghan, V., Sood, A.K., 2018. The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and Opportunities. *Cancer Cell* 33, 965–983.

Hajjar, K.A., 2003. The molecular basis of fibrinolysis, in: *Hematology of Infancy and Childhood*. Philadelphia, USA, pp. 1497–1514.

Hansson, K.M., Nielsen, S., Elg, M., Deinum, J., 2014. The effect of corn trypsin inhibitor and inhibiting antibodies for FXIa and FXIIa on coagulation of plasma and whole blood. *J Thromb Haemost* 12, 1678–1686.

Harper, M.T., Poole, A.W., 2010. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost* 8, 454–462.

Harrison, P., Cramer, E.M., 1993. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 7, 52–62.

Hartopo, A.B., Puspitawati, I., Gharini, P.P.R., Setianto, B.Y., 2016. Platelet microparticle number is associated with the extent of myocardial damage in acute myocardial infarction. *Arch Med Sci* 12, 529–537.

Hayward, C.P.M., Harrison, P., Cattaneo, M., Ortel, T.L., Rao, A.K., Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2006. Platelet function

analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J. Thromb. Haemost.* 4, 312–319.

He, S., Bremme, K., Blombäck, M., 1999. A laboratory method for determination of overall haemostatic potential in plasma. I. Method design and preliminary results. *Thromb Res* 96, 145–156.

Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017, 2019. *Lancet* 393, 1958–1972.

Heemskerk, J.W.M., Bevers, E.M., Lindhout, T., 2002. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb. Haemost.* 88, 186–193.

Heeschen, C., Dimmeler, S., Hamm, C.W., van den Brand, M.J., Boersma, E., Zeiher, A.M., Simoons, M.L., CAPTURE Study Investigators, 2003. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 348, 1104–1111.

Hemker, H.C., Béguin, S., 2000. Phenotyping the clotting system. *Thromb. Haemost.* 84, 747–751.

Hemker, H. Coenraad, Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., de Smedt, E., Wagenvoord, R., Lecompte, T., Béguin, S., 2003. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33, 4–15.

Hemker, H.C., Giesen, P., AlDieri, R., Regnault, V., de Smed, E., Wagenvoord, R., Lecompte, T., Béguin, S., 2002. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 32, 249–253.

Hemker, H.C., Wielders, S., Kessels, H., Béguin, S., 1993. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb. Haemost.* 70, 617–624.

Heptinstall, S., May, J., Fox, S., Kwik-Urbe, C., Zhao, L., 2006. Cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: recent in vitro and ex vivo studies in healthy adults. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47 Suppl 2, S197-205; discussion S206-209.

- Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D., 1994. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer* 22, 175–184.
- Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342, 1007–1011.
- Higdon, J.V., Frei, B., 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43, 89–143.
- Hoffman, M., 2003. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* 17 Suppl 1, S1-5.
- Hoffman, M., Monroe, D.M., 2001. A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* 85, 958–965.
- Holmes, W.E., Nelles, L., Lijnen, H.R., Collen, D., 1987. Primary structure of human alpha 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). *J. Biol. Chem.* 262, 1659–1664.
- Holt, R.R., Schramm, D.D., Keen, C.L., Lazarus, S.A., Schmitz, H.H., 2002. Chocolate consumption and platelet function. *JAMA* 287, 2212–2213.
- Horn, P., Amabile, N., Angeli, F.S., Sansone, R., Stegeman, B., Kelm, M., Springer, M.L., Yeghiazarians, Y., Schroeter, H., Heiss, C., 2014. Dietary flavanol intervention lowers the levels of endothelial microparticles in coronary artery disease patients. *Br J Nutr* 111, 1245–1252.
- Hoylaerts, M., Rijken, D.C., Lijnen, H.R., Collen, D., 1982. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J. Biol. Chem.* 257, 2912–2919.
- Hvas, A.-M., Favalaro, E.J., 2017. Platelet Function Analyzed by Light Transmission Aggregometry. *Methods Mol. Biol.* 1646, 321–331.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687.
- Ichinose, A., Takio, K., Fujikawa, K., 1986. Localization of the binding site of tissue-type plasminogen activator to fibrin. *J Clin Invest* 78, 163–169.

- Ilich, A., Bokarev, I., Key, N.S., 2017. Global assays of fibrinolysis. *Int J Lab Hematol* 39, 441–447.
- Innes, A.J., Kennedy, G., McLaren, M., Bancroft, A.J., Belch, J.J.F., 2003. Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Platelets* 14, 325–327.
- Italiano, J.E., Mairuhu, A.T.A., Flaumenhaft, R., 2010. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 578–584.
- Joshi, S., Whiteheart, S.W., 2017. The nuts and bolts of the platelet release reaction. *Platelets* 28, 129–137.
- Just, S., 2017. Laboratory Testing for von Willebrand Disease: The Past, Present, and Future State of Play for von Willebrand Factor Assays that Measure Platelet Binding Activity, with or without Ristocetin. *Semin. Thromb. Hemost.* 43, 75–91.
- Kang, W.S., Chung, K.H., Chung, J.H., Lee, J.Y., Park, J.B., Zhang, Y.H., Yoo, H.S., Yun, Y.P., 2001. Antiplatelet activity of green tea catechins is mediated by inhibition of cytoplasmic calcium increase. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38, 875–884.
- Karpińska, I.A., Nowakowski, T., Wypasek, E., Plens, K., Undas, A., 2020. A prothrombotic state and denser clot formation in patients following acute limb ischemia of unknown cause. *Thromb. Res.* 187, 32–38.
- Kasai, S., Arimura, H., Nishida, M., Suyama, T., 1985. Primary structure of single-chain pro-urokinase. *J. Biol. Chem.* 260, 12382–12389.
- Kaur, G., Roberti, M., Raul, F., Pendurthi, U.R., 2007. Suppression of human monocyte tissue factor induction by red wine phenolics and synthetic derivatives of resveratrol. *Thromb Res* 119, 247–256.
- Kawai, Y., Matsumoto, Y., Watanabe, K., Yamamoto, H., Satoh, K., Murata, M., Handa, M., Ikeda, Y., 1996. Hemodynamic forces modulate the effects of cytokines on fibrinolytic activity of endothelial cells. *Blood* 87, 2314–2321.
- Khodadi, E., 2020. Platelet Function in Cardiovascular Disease: Activation of Molecules and Activation by Molecules. *Cardiovasc Toxicol* 20, 1–10.

Kirchhofer, D., Lipari, M.T., Moran, P., Eigenbrot, C., Kelley, R.F., 2000. The tissue factor region that interacts with substrates factor IX and Factor X. *Biochemistry* 39, 7380–7387.

Knittel, T., Fellmer, P., Ramadori, G., 1996. Gene expression and regulation of plasminogen activator inhibitor type I in hepatic stellate cells of rat liver. *Gastroenterology* 111, 745–754.

Kolodziejczyk-Czepas, J., Ponczek, M.B., Nowak, P., 2015. Peroxynitrite and fibrinolytic system-The effects of peroxynitrite on t-PA-induced plasmin activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 81, 212–219.

Konstantinides, S.V., Meyer, G., Becattini, C., Bueno, H., Geersing, G.-J., Harjola, V.-P., Huisman, M.V., Humbert, M., Jennings, C.S., Jiménez, D., Kucher, N., Lang, I.M., Lankeit, M., Lorusso, R., Mazzolai, L., Meneveau, N., Áinle, F.N., Prandoni, P., Pruszczyk, P., Righini, M., Torbicki, A., Van Belle, E., Zamorano, J.L., The Task Force for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism of the European Society of Cardiology (ESC), 2019. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS): The Task Force for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Respir. J.* 54.

Krishnaswamy, S., 2013. The transition of prothrombin to thrombin. *J. Thromb. Haemost.* 11 Suppl 1, 265–276.

Kruithof, E.K., 1988. Plasminogen activator inhibitors--a review. *Enzyme* 40, 113–121.

Kuriyama, N., Nagakane, Y., Hosomi, A., Ohara, T., Kasai, T., Harada, S., Takeda, K., Yamada, K., Ozasa, K., Tokuda, T., Watanabe, Y., Mizuno, T., Nakagawa, M., 2010. Evaluation of factors associated with elevated levels of platelet-derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 16, 26–32.

Lacroix, R., Judicone, C., Mooberry, M., Boucekine, M., Key, N.S., Dignat-George, F., The ISTH SSC Workshop, 2013. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J. Thromb. Haemost.*

Lacroix, R., Robert, S., Poncelet, P., Kasthuri, R.S., Key, N.S., Dignat-George, F., ISTH SSC Workshop, 2010. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J. Thromb. Haemost.* 8, 2571–2574.

Lampridou, M., Sokou, R., Tsantes, A.G., Theodoraki, M., Konstantinidi, A., Ioakeimidis, G., Bonovas, S., Politou, M., Valsami, S., Iliodromiti, Z., Boutsikou, T., Iacovidou, N., Nikolopoulos, G., Tsantes, A.E., 2020. ROTEM diagnostic capacity for measuring fibrinolysis in neonatal sepsis. *Thromb Res* 192, 103–108.

Lassègue, B., San Martín, A., Griendling, K.K., 2012. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res* 110, 1364–1390.

Lau, A., Berry, L.R., Mitchell, L.G., Chan, A.K.C., 2007. Effect of substrate and fibrin polymerization inhibitor on determination of plasma thrombin generation in vitro. *Thromb. Res.* 119, 667–677.

Law, R.H.P., Caradoc-Davies, T., Cowieson, N., Horvath, A.J., Quek, A.J., Encarnacao, J.A., Steer, D., Cowan, A., Zhang, Q., Lu, B.G.C., Pike, R.N., Smith, A.I., Coughlin, P.B., Whisstock, J.C., 2012. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep* 1, 185–190.

Lebas, H., Yahiaoui, K., Martos, R., Boulaftali, Y., 2019. Platelets Are at the Nexus of Vascular Diseases. *Front Cardiovasc Med* 6, 132.

Lee, H.S., Jun, J.-H., Jung, E.-H., Koo, B.A., Kim, Y.S., 2014. Epigallocatechin-3-gallate inhibits ocular neovascularization and vascular permeability in human retinal pigment epithelial and human retinal microvascular endothelial cells via suppression of MMP-9 and VEGF activation. *Molecules* 19, 12150–12172.

Lee, M.J., Wang, Z.Y., Li, H., Chen, L., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D.A., Yang, C.S., 1995. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4, 393–399.

Leebeek, F.W.G., Eikenboom, J.C.J., 2016. Von Willebrand's Disease. *N. Engl. J. Med.* 375, 2067–2080.

Lehman, C.M., Blaylock, R.C., Alexander, D.P., Rodgers, G.M., 2001. Discontinuation of the bleeding time test without detectable adverse clinical impact. *Clin. Chem.* 47, 1204–1211.

Lhermusier, T., Chap, H., Payrastre, B., 2011. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 9, 1883–1891.

Li, P., Liu, A., Xiong, W., Lin, H., Xiao, W., Huang, J., Zhang, S., Liu, Z., 2020. Catechins enhance skeletal muscle performance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 60, 515–528.

Li, Q.-Q., Yang, Y.-X., Qv, J.-W., Hu, G., Hu, Y.-J., Xia, Z.-N., Yang, F.-Q., 2018. Investigation of Interactions between Thrombin and Ten Phenolic Compounds by Affinity Capillary Electrophoresis and Molecular Docking. *J Anal Methods Chem* 2018, 4707609.

Li, W., Johnson, D.J.D., Esmon, C.T., Huntington, J.A., 2004. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 857–862.

Li, Y.-H., Kuo, C.-H., Shi, G.-Y., Wu, H.-L., 2012. The role of thrombomodulin lectin-like domain in inflammation. *J Biomed Sci* 19, 34.

Lim, S.S., Vos, T., Flaxman, A.D., Danaei, G., Shibuya, K., Adair-Rohani, H., Amann, M., Anderson, H.R., Andrews, K.G., Aryee, M., Atkinson, C., Bacchus, L.J., Bahalim, A.N., Balakrishnan, K., Balmes, J., Barker-Collo, S., Baxter, A., Bell, M.L., Blore, J.D., Blyth, F., Bonner, C., Borges, G., Bourne, R., Boussinesq, M., Brauer, M., Brooks, P., Bruce, N.G., Brunekreef, B., Bryan-Hancock, C., Bucello, C., Buchbinder, R., Bull, F., Burnett, R.T., Byers, T.E., Calabria, B., Carapetis, J., Carnahan, E., Chafe, Z., Charlson, F., Chen, H., Chen, J.S., Cheng, A.T.-A., Child, J.C., Cohen, A., Colson, K.E., Cowie, B.C., Darby, S., Darling, S., Davis, A., Degenhardt, L., Dentener, F., Des Jarlais, D.C., Devries, K., Dherani, M., Ding, E.L., Dorsey, E.R., Driscoll, T., Edmond, K., Ali, S.E., Engell, R.E., Erwin, P.J., Fahimi, S., Falder, G., Farzadfar, F., Ferrari, A., Finucane, M.M., Flaxman, S., Fowkes, F.G.R., Freedman, G., Freeman, M.K., Gakidou, E., Ghosh, S., Giovannucci, E., Gmel, G., Graham, K., Grainger, R., Grant, B., Gunnell, D., Gutierrez, H.R., Hall, W., Hoek, H.W., Hogan, A., Hosgood, H.D., Hoy, D., Hu, H.,

Hubbell, B.J., Hutchings, S.J., Ibeanusi, S.E., Jacklyn, G.L., Jasrasaria, R., Jonas, J.B., Kan, H., Kanis, J.A., Kassebaum, N., Kawakami, N., Khang, Y.-H., Khatibzadeh, S., Khoo, J.-P., Kok, C., Laden, F., Lalloo, R., Lan, Q., Lathlean, T., Leasher, J.L., Leigh, J., Li, Y., Lin, J.K., Lipshultz, S.E., London, S., Lozano, R., Lu, Y., Mak, J., Malekzadeh, R., Mallinger, L., Marcenes, W., March, L., Marks, R., Martin, R., McGale, P., McGrath, J., Mehta, S., Mensah, G.A., Merriman, T.R., Micha, R., Michaud, C., Mishra, V., Hanafiah, K.M., Mokdad, A.A., Morawska, L., Mozaffarian, D., Murphy, T., Naghavi, M., Neal, B., Nelson, P.K., Nolla, J.M., Norman, R., Olives, C., Omer, S.B., Orchard, J., Osborne, R., Ostro, B., Page, A., Pandey, K.D., Parry, C.D.H., Passmore, E., Patra, J., Pearce, N., Pelizzari, P.M., Petzold, M., Phillips, M.R., Pope, D., Pope III, C.A., Powles, J., Rao, M., Razavi, H., Rehfuss, E.A., Rehm, J.T., Ritz, B., Rivara, F.P., Roberts, T., Robinson, C., Rodriguez-Portales, J.A., Romieu, I., Room, R., Rosenfeld, L.C., Roy, A., Rushton, L., Salomon, J.A., Sampson, U., Sanchez-Riera, L., Sanman, E., Sapkota, A., Seedat, S., Shi, P., Shield, K., Shivakoti, R., Singh, G.M., Sleet, D.A., Smith, E., Smith, K.R., Stapelberg, N.J.C., Steenland, K., Stöckl, H., Stovner, L.J., Straif, K., Straney, L., Thurston, G.D., Tran, J.H., Van Dingenen, R., van Donkelaar, A., Veerman, J.L., Vijayakumar, L., Weintraub, R., Weissman, M.M., White, R.A., Whiteford, H., Wiersma, S.T., Wilkinson, J.D., Williams, H.C., Williams, W., Wilson, N., Woolf, A.D., Yip, P., Zielinski, J.M., Lopez, A.D., Murray, C.J.L., Ezzati, M., 2012. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380, 2224–2260.

Lim, W., Le Gal, G., Bates, S.M., Righini, M., Haramati, L.B., Lang, E., Kline, J.A., Chasteen, S., Snyder, M., Patel, Payal, Bhatt, M., Patel, Parth, Braun, C., Begum, H., Wiercioch, W., Schünemann, H.J., Mustafa, R.A., 2018. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: diagnosis of venous thromboembolism. *Blood Adv* 2, 3226–3256.

Lin, Y.-T., Wu, Y.-H., Tseng, C.-K., Lin, C.-K., Chen, W.-C., Hsu, Y.-C., Lee, J.-C., 2013. Green tea phenolic epicatechins inhibit hepatitis C virus replication via cyclooxygenase-2 and attenuate virus-induced inflammation. *PLoS One* 8, e54466.

Lind, S.E., 1991. The bleeding time does not predict surgical bleeding. *Blood* 77, 2547–2552.

- Liu, J., Ying, C., Meng, Y., Yi, W., Fan, Z., Zuo, X., Tian, C., Sun, X., 2009. Green tea polyphenols inhibit plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in endothelial cells. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 20, 552–557.
- Liu, L., Ma, H., Yang, N., Tang, Y., Guo, J., Tao, W., Duan, J., 2010. A Series of Natural Flavonoids as Thrombin Inhibitors: Structure-activity relationships. *Thrombosis Research* 126, e365–e378.
- Liu, M.-L., Reilly, M.P., Casasanto, P., McKenzie, S.E., Williams, K.J., 2007. Cholesterol Enrichment of Human Monocyte/Macrophages Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and the Release of Biologically-Active Tissue Factor–Positive Microvesicles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 430–435.
- Liu, X.-M., Liu, Y.-J., Huang, Y., Yu, H.-J., Yuan, S., Tang, B.-W., Wang, P.-G., He, Q.-Q., 2017. Dietary total flavonoids intake and risk of mortality from all causes and cardiovascular disease in the general population: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Mol Nutr Food Res* 61.
- Löf, A., Müller, J.P., Brehm, M.A., 2018. A biophysical view on von Willebrand factor activation. *Journal of Cellular Physiology* 233, 799–810.
- Longstaff, C., 2018. Measuring fibrinolysis: from research to routine diagnostic assays. *J. Thromb. Haemost.* 16, 652–662.
- Longstaff, C., Kolev, K., 2015. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost.* 13 Suppl 1, S98-105.
- Lovren, F., Verma, S., 2013. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin. Chem.* 59, 1166–1174.
- Lowe, G., Rumley, A., 2014. The relevance of coagulation in cardiovascular disease: what do the biomarkers tell us? *Thromb. Haemost.* 112, 860–867.
- Macey, M.G., Enniks, N., Bevan, S., 2011. Flow cytometric analysis of microparticle phenotype and their role in thrombin generation. *Cytometry B Clin Cytom* 80, 57–63.
- Machin, S.J., 2003. Pros and cons of thrombophilia testing: cons. *J. Thromb. Haemost.* 1, 412–413.

- Mackman, N., Tilley, R.E., Key, N.S., 2007. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1687–1693.
- Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Lesèche, G., Freyssinet, J.M., Tedgui, A., 1999. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 99, 348–353.
- Mann, K.G., Butenas, S., Brummel, K., 2003. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 17–25.
- Mann, K.G., Kalafatis, M., 2003. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood* 101, 20–30.
- Martinelli, I., 2003. Pros and cons of thrombophilia testing: pros. *J. Thromb. Haemost.* 1, 410–411.
- Matafonov, A., Sarilla, S., Sun, M., Sheehan, J.P., Serebrov, V., Verhamme, I.M., Gailani, D., 2011. Activation of factor XI by products of prothrombin activation. *Blood* 118, 437–445.
- Mazurkiewicz-Pisarek, A., Płucienniczak, G., Ciach, T., Płucienniczak, A., 2016. The factor VIII protein and its function. *Acta Biochim. Pol.* 63, 11–16.
- McEwen, B.J., 2014. The influence of diet and nutrients on platelet function. *Semin. Thromb. Hemost.* 40, 214–226.
- McFarlin, B.K., Venable, A.S., Henning, A.L., Prado, E.A., Best Sampson, J.N., Vingren, J.L., Hill, D.W., 2015. Natural cocoa consumption: Potential to reduce atherogenic factors? *J Nutr Biochem* 26, 626–632.
- McGinn, C.M., MacDonnell, B.F., Shan, C.X., Wallace, R., Cummins, P.M., Murphy, R.P., 2016. Microparticles: A Pivotal Nexus in Vascular Homeostasis and Disease. *Curr Clin Pharmacol* 11, 28–42.
- McNicol, A., Israels, S.J., 1999. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* 95, 1–18.
- Medved, L., Nieuwenhuizen, W., 2003. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb. Haemost.* 89, 409–419.

Melki, I., Tessandier, N., Zufferey, A., Boilard, E., 2017. Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets* 28, 214–221.

Mezzano, D., Quiroga, T., 2019. Diagnostic challenges of inherited mild bleeding disorders: a bait for poorly explored clinical and basic research. *J. Thromb. Haemost.* 17, 257–270.

Micha, R., Shulkin, M.L., Peñalvo, J.L., Khatibzadeh, S., Singh, G.M., Rao, M., Fahimi, S., Powles, J., Mozaffarian, D., 2017. Etiologic effects and optimal intakes of foods and nutrients for risk of cardiovascular diseases and diabetes: Systematic reviews and meta-analyses from the Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCoDE). *PLoS One* 12, e0175149.

Michelsen, A.E., Brodin, E., Brosstad, F., Hansen, J.-B., 2008. Increased level of platelet microparticles in survivors of myocardial infarction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 68, 386–392.

Michelsen, A.E., Notø, A.-T., Brodin, E., Mathiesen, E.B., Brosstad, F., Hansen, J.-B., 2009. Elevated levels of platelet microparticles in carotid atherosclerosis and during the postprandial state. *Thromb. Res.* 123, 881–886.

Mihalko, E., Brown, A.C., 2020. Clot Structure and Implications for Bleeding and Thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* 46, 96–104.

Milenkovic, D., Declerck, K., Guttman, Y., Kerem, Z., Claude, S., Weseler, A.R., Bast, A., Schroeter, H., Morand, C., Vanden Berghe, W., 2020. (-)-Epicatechin metabolites promote vascular health through epigenetic reprogramming of endothelial-immune cell signaling and reversing systemic low-grade inflammation. *Biochem Pharmacol* 173, 113699.

Mills, J.D., Ariëns, R.A.S., Mansfield, M.W., Grant, P.J., 2002. Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 106, 1938–1942.

Mitchell, J.L., Lionikiene, A.S., Georgiev, G., Klemmer, A., Brain, C., Kim, P.Y., Mutch, N.J., 2016. Polyphosphate colocalizes with factor XII on platelet-bound fibrin and augments its plasminogen activator activity. *Blood* 128, 2834–2845.

Mohan Rao, L.V., Esmon, C.T., Pendurthi, U.R., 2014. Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood* 124, 1553–1562.

Montagnana, M., Danese, E., Angelino, D., Mena, P., Rosi, A., Benati, M., Gelati, M., Salvagno, G.L., Favalaro, E.J., Del Rio, D., Lippi, G., 2018. Dark chocolate modulates platelet function with a mechanism mediated by flavan-3-ol metabolites. *Medicine (Baltimore)* 97, e13432.

Moran, J., Bauer, K.A., 2020. Managing thromboembolic risk in patients with hereditary and acquired thrombophilias. *Blood* 135, 344–350.

Morand, C., Manach, C., Crespy, V., Remesy, C., 2000. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic Res* 33, 667–676.

Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.-M., Toti, F., 2011. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 15–26.

Mosesson, M.W., 2005. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1894–1904.

Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., Eleuteri, A.M., Fioretti, E., Angeletti, M., 2006. Flavonoids inhibit the amidolytic activity of human thrombin. *Biochimie* 88, 1297–1306.

Mullen, W., Borges, G., Donovan, J.L., Edwards, C.A., Serafini, M., Lean, M.E.J., Crozier, A., 2009. Milk decreases urinary excretion but not plasma pharmacokinetics of cocoa flavan-3-ol metabolites in humans. *Am J Clin Nutr* 89, 1784–1791.

Mullins, A.P., Arjmandi, B.H., 2021. Health Benefits of Plant-Based Nutrition: Focus on Beans in Cardiometabolic Diseases. *Nutrients* 13.

Murphy, K.J., Chronopoulos, A.K., Singh, I., Francis, M.A., Moriarty, H., Pike, M.J., Turner, A.H., Mann, N.J., Sinclair, A.J., 2003. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1466–1473.

Mutch, N.J., Moore, N.R., Wang, E., Booth, N.A., 2003. Thrombus lysis by uPA, scuPA and tPA is regulated by plasma TAFI. *J. Thromb. Haemost.* 1, 2000–2007.

Nagata, S., Sakuragi, T., Segawa, K., 2020. Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure. *Curr. Opin. Immunol.* 62, 31–38.

Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K., Fujii, T., 2016. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ.* 23, 952–961.

Natsume, M., Osakabe, N., Oyama, M., Sasaki, M., Baba, S., Nakamura, Y., Osawa, T., Terao, J., 2003. Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med* 34, 840–849.

Naveed, M., Majeed, F., Taleb, A., Zubair, H.M., Shumzaid, M., Farooq, M.A., Baig, M.M.F.A., Abbas, M., Saeed, M., Changxing, L., 2020. A Review of Medicinal Plants in Cardiovascular Disorders: Benefits and Risks. *Am J Chin Med* 48, 259–286.

Neiva, T.J., Morais, L., Polack, M., Simões, C.M., D’Amico, E.A., 1999. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. *Phytother Res* 13, 597–600.

Nesheim, M., Bajzar, L., 2005. The discovery of TAFI. *J. Thromb. Haemost.* 3, 2139–2146.

Nichols, W.L., Hultin, M.B., James, A.H., Manco-Johnson, M.J., Montgomery, R.R., Ortel, T.L., Rick, M.E., Sadler, J.E., Weinstein, M., Yawn, B.P., 2008. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 14, 171–232.

Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A., Oleszek, W., 2012a. The polyphenol-rich extract from grape seeds inhibits platelet signaling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Platelets* 23, 282–289.

Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A., Oleszek, W., 2012b. The polyphenol-rich extract from grape seeds inhibits platelet signaling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Platelets* 23, 282–289.

Ollivier, V., Wang, J., Manly, D., Machlus, K.R., Wolberg, A.S., Jandrot-Perrus, M., Mackman, N., 2010. DETECTION OF ENDOGENOUS TISSUE FACTOR LEVELS IN PLASMA USING THE CALIBRATED AUTOMATED THROMBOGRAM ASSAY. *Thromb Res* 125, 90–96.

Olson, S.T., Björk, I., Sheffer, R., Craig, P.A., Shore, J.D., Choay, J., 1992. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational

change contribution to heparin rate enhancement. *J. Biol. Chem.* 267, 12528–12538.

Olson, S.T., Richard, B., Izaguirre, G., Schedin-Weiss, S., Gettins, P.G.W., 2010. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. a paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie* 92, 1587–1596.

Ostertag, L.M., Kroon, P.A., Wood, S., Horgan, G.W., Cienfuegos-Jovellanos, E., Saha, S., Duthie, G.G., de Roos, B., 2013. Flavan-3-ol-enriched dark chocolate and white chocolate improve acute measures of platelet function in a gender-specific way--a randomized-controlled human intervention trial. *Mol Nutr Food Res* 57, 191–202.

Ostertag, L.M., O'Kennedy, N., Kroon, P.A., Duthie, G.G., de Roos, B., 2010. Impact of dietary polyphenols on human platelet function--a critical review of controlled dietary intervention studies. *Mol Nutr Food Res* 54, 60–81.

Ottaviani, J.I., Borges, G., Momma, T.Y., Spencer, J.P.E., Keen, C.L., Crozier, A., Schroeter, H., 2016. The metabolome of [2-(14)C](-)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Sci Rep* 6, 29034.

Ottaviani, J.I., Momma, T.Y., Heiss, C., Kwik-Urbe, C., Schroeter, H., Keen, C.L., 2011. The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 237–244.

Ottaviani, J.I., Momma, T.Y., Kuhnle, G.K., Keen, C.L., Schroeter, H., 2012. Structurally related (-)-epicatechin metabolites in humans: assessment using de novo chemically synthesized authentic standards. *Free Radic Biol Med* 52, 1403–1412.

Owens, A.P., Mackman, N., 2011. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res.* 108, 1284–1297.

Pan, J., Dinh, T.T., Rajaraman, A., Lee, M., Scholz, A., Czupalla, C.J., Kiefel, H., Zhu, L., Xia, L., Morser, J., Jiang, H., Santambrogio, L., Butcher, E.C., 2016. Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo. *Blood* 128, 104–109.

- Pardo, F., Villalobos-Labra, R., Sobrevia, B., Toledo, F., Sobrevia, L., 2018. Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. *Mol. Aspects Med.* 60, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.010>
- Parmenter, B.H., Croft, K.D., Hodgson, J.M., Dalgaard, F., Bondonno, C.P., Lewis, J.R., Cassidy, A., Scalbert, A., Bondonno, N.P., 2020. An overview and update on the epidemiology of flavonoid intake and cardiovascular disease risk. *Food Funct* 11, 6777–6806.
- Payne, M.J., Hurst, W.J., Miller, K.B., Rank, C., Stuart, D.A., 2010. Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *J Agric Food Chem* 58, 10518–10527.
- Pearson, D.A., Paglieroni, T.G., Rein, D., Wun, T., Schramm, D.D., Wang, J.F., Holt, R.R., Gosselin, R., Schmitz, H.H., Keen, C.L., 2002. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function.
- Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vehar, G.A., Ward, C.A., Bennett, W.F., Yelverton, E., Seeburg, P.H., Heyneker, H.L., Goeddel, D.V., Collen, D., 1983. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 301, 214–221.
- Pereira, B., Brazón, J., 2015. Aqueous extract from *Brownea grandiceps* flowers with effect on coagulation and fibrinolytic system. *J Ethnopharmacol* 160, 6–13.
- Pereira, B., Brazón, J., Rincón, M., Vonasek, E., 2017. Browplasminin, a condensed tannin with anti-plasmin activity isolated from an aqueous extract of *Brownea grandiceps* Jacq. flowers. *J Ethnopharmacol* 198, 282–290.
- Pereira-Caro, G., Moreno-Rojas, J.M., Brindani, N., Del Rio, D., Lean, M.E.J., Hara, Y., Crozier, A., 2017. Bioavailability of Black Tea Theaflavins: Absorption, Metabolism, and Colonic Catabolism. *J Agric Food Chem* 65, 5365–5374.
- Pérez-Jiménez, J., Fezeu, L., Touvier, M., Arnault, N., Manach, C., Hercberg, S., Galan, P., Scalbert, A., 2011. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr* 93, 1220–1228.
- Peyvandi, F., Di Michele, D., Bolton-Maggs, P.H.B., Lee, C.A., Tripodi, A., Srivastava, A., Project on Consensus Definitions in Rare Bleeding Disorders of the Factor VIII/Factor IX Scientific and Standardisation Committee of the International

Society on Thrombosis and Haemostasis, 2012a. Classification of rare bleeding disorders (RBDs) based on the association between coagulant factor activity and clinical bleeding severity. *J. Thromb. Haemost.* 10, 1938–1943.

Peyvandi, F., Palla, R., Menegatti, M., Siboni, S.M., Halimeh, S., Faeser, B., Pergantou, H., Platokouki, H., Giangrande, P., Peerlinck, K., Celkan, T., Ozdemir, N., Bidlingmaier, C., Ingerslev, J., Giansily-Blaizot, M., Schved, J.F., Gilmore, R., Gadisseur, A., Benedik-Dolničar, M., Kitanovski, L., Mikovic, D., Musallam, K.M., Rosendaal, F.R., European Network of Rare Bleeding Disorders Group, 2012b. Coagulation factor activity and clinical bleeding severity in rare bleeding disorders: results from the European Network of Rare Bleeding Disorders. *J. Thromb. Haemost.* 10, 615–621.

Pieters, M., de Maat, M.P.M., 2015. Diet and haemostasis - a comprehensive overview. *Blood Rev* 29, 231–241.

Pieters, M., Philippou, H., Undas, A., de Lange, Z., Rijken, D.C., Mutch, N.J., Subcommittee on Factor XIII and Fibrinogen, and the Subcommittee on Fibrinolysis, 2018. An international study on the feasibility of a standardized combined plasma clot turbidity and lysis assay: communication from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 16, 1007–1012.

Pignatelli, P., Pulcinelli, F.M., Celestini, A., Lenti, L., Ghiselli, A., Gazzaniga, P.P., Violi, F., 2000. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 1150–1155.

Pike, R.N., Buckle, A.M., le Bonniec, B.F., Church, F.C., 2005. Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS J.* 272, 4842–4851.

Pike, R.N., Potempa, J., Skinner, R., Fitton, H.L., McGraw, W.T., Travis, J., Owen, M., Jin, L., Carrell, R.W., 1997. Heparin-dependent modification of the reactive center arginine of antithrombin and consequent increase in heparin binding affinity. *J. Biol. Chem.* 272, 19652–19655.

Plantureux, L., Mège, D., Crescence, L., Carminita, E., Robert, S., Cointe, S., Brouilly, N., Ezzedine, W., Dignat-George, F., Dubois, C., Panicot-Dubois, L., 2020. The Interaction of Platelets with Colorectal Cancer Cells Inhibits Tumor Growth but Promotes Metastasis. *Cancer Res.* 80, 291–303.

Polack, B., 2003. [Thrombin: a multifunctional enzyme]. *Ann Biol Clin (Paris)* 61, 23–31.

Pontifex, M.G., Malik, M.M.A.H., Connell, E., Müller, M., Vauzour, D., 2021. Citrus Polyphenols in Brain Health and Disease: Current Perspectives. *Front Neurosci* 15, 640648.

Preston, R.J.S., Villegas-Mendez, A., Sun, Y.-H., Hermida, J., Simioni, P., Philippou, H., Dahlbäck, B., Lane, D.A., 2005. Selective modulation of protein C affinity for EPCR and phospholipids by Gla domain mutation. *FEBS J.* 272, 97–108.

Prince, P.D., Fischerman, L., Toblli, J.E., Fraga, C.G., Galleano, M., 2017. LPS-induced renal inflammation is prevented by (-)-epicatechin in rats. *Redox Biol* 11, 342–349.

Prince, P.D., Rodríguez Lanzi, C., Fraga, C.G., Galleano, M., 2019. Dietary (-)-epicatechin affects NF- κ B activation and NADPH oxidases in the kidney cortex of high-fructose-fed rats. *Food Funct* 10, 26–32.

Prior, R.L., Gu, L., 2005. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* 66, 2264–2280.

Pruthi, R.K., 2017. Optimal utilization of thrombophilia testing. *Int J Lab Hematol* 39 Suppl 1, 104–110.

Puy, C., Rigg, R.A., McCarty, O.J.T., 2016. The hemostatic role of factor XI. *Thromb Res* 141, S8–S11.

Qu, Z., Liu, A., Li, P., Liu, C., Xiao, W., Huang, J., Liu, Z., Zhang, S., 2020. Advances in physiological functions and mechanisms of (-)-epicatechin. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1–23.

Quach, M.E., Chen, W., Li, R., 2018. Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. *Blood* 131, 1512–1521.

Quinsey, N.S., Greedy, A.L., Bottomley, S.P., Whisstock, J.C., Pike, R.N., 2004. Antithrombin: in control of coagulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 386–389.

Rabadán-Chávez, G.M., Reyes-Maldonado, E., Quevedo-Corona, L., Paniagua-Castro, N., Escalona-Cardoso, G., Jaramillo-Flores, M.E., 2016. The prothrombotic state associated with obesity-induced hypertension is reduced by cocoa and its main flavanols. *Food Funct* 7, 4880–4888.

- Raeven, P., Zipperle, J., Drechsler, S., 2018. Extracellular Vesicles as Markers and Mediators in Sepsis. *Theranostics* 8, 3348–3365.
- Rajaram, S., 2003. The effect of vegetarian diet, plant foods, and phytochemicals on hemostasis and thrombosis. *Am J Clin Nutr* 78, 552S-558S.
- Rand, K.D., Jørgensen, T.J.D., Olsen, O.H., Persson, E., Jensen, O.N., Stennicke, H.R., Andersen, M.D., 2006. Allosteric activation of coagulation factor VIIa visualized by hydrogen exchange. *J. Biol. Chem.* 281, 23018–23024.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, M.Z., 2006. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20, 1487–1495.
- Rau, J.C., Beaulieu, L.M., Huntington, J.A., Church, F.C., 2007. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 5, 102–115.
- Rauf, A., Imran, M., Abu-Izneid, T., Iahtisham-Ul-Haq, null, Patel, S., Pan, X., Naz, S., Sanches Silva, A., Saeed, F., Rasul Suleria, H.A., 2019. Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother* 116, 108999.
- Rein, D., Lotito, S., Holt, R.R., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G., 2000a. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 130, 2109S–14S.
- Rein, D., Paglieroni, T.G., Pearson, D.A., Wun, T., Schmitz, H.H., Gosselin, R., Keen, C.L., 2000b. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J Nutr* 130, 2120S–6S.
- Rein, D., Paglieroni, T.G., Wun, T., Pearson, D.A., Schmitz, H.H., Gosselin, R., Keen, C.L., 2000c. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 30–35.
- Ridger, V.C., Boulanger, C.M., Angelillo-Scherrer, A., Badimon, L., Blanc-Brude, O., Bochaton-Piallat, M.-L., Boilard, E., Buzas, E.I., Caporali, A., Dignat-George, F., Evans, P.C., Lacroix, R., Lutgens, E., Ketelhuth, D.F.J., Nieuwland, R., Toti, F., Tunon, J., Weber, C., Hoefer, I.E., 2017. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. *Thromb Haemost* 117, 1296–1316.
- Ried, K., Sullivan, T.R., Fakler, P., Frank, O.R., Stocks, N.P., 2012. Effect of cocoa on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev* CD008893.

- Rijken, D.C., Hoegee-de Nobel, E., Jie, A.F.H., Atsma, D.E., Schlij, M.J., Nieuwenhuizen, W., 2008. Development of a new test for the global fibrinolytic capacity in whole blood. *J Thromb Haemost* 6, 151–157.
- Rios, L.Y., Bennett, R.N., Lazarus, S.A., Rémésy, C., Scalbert, A., Williamson, G., 2002. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr* 76, 1106–1110.
- Roberts, H.R., Cederbaum, A.I., 1972. The liver and blood coagulation: physiology and pathology. *Gastroenterology* 63, 297–320.
- Rodriguez-Mateos, A., Cifuentes-Gomez, T., Gonzalez-Salvador, I., Ottaviani, J.I., Schroeter, H., Kelm, M., Heiss, C., Spencer, J.P.E., 2015. Influence of age on the absorption, metabolism, and excretion of cocoa flavanols in healthy subjects. *Mol Nutr Food Res* 59, 1504–1512.
- Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C.G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., Mena, P., Del Rio, D., Crozier, A., 2014. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch Toxicol* 88, 1803–1853.
- Roychoudhury, P.K., Khaparde, S.S., Mattiasson, B., Kumar, A., 2006. Synthesis, regulation and production of urokinase using mammalian cell culture: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 24, 514–528.
- Ruggeri, Z.M., 2009. Platelet Adhesion under Flow. *Microcirculation* 16, 58–83.
- Ruggeri, Z.M., Mendolicchio, G.L., 2007. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ. Res.* 100, 1673–1685.
- Ruggeri, Z.M., Orje, J.N., Habermann, R., Federici, A.B., Reininger, A.J., 2006. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood* 108, 1903–1910.
- Ruggeri, Z.M., Zarpellon, A., Roberts, J.R., Mc Clintock, R.A., Jing, H., Mendolicchio, G.L., 2010. Unravelling the mechanism and significance of thrombin binding to platelet glycoprotein Ib. *Thromb. Haemost.* 104, 894–902.
- Salvemini, D., Botting, R., 1993. Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. *Trends Pharmacol Sci* 14, 36–42.

Sanches Silva, A., Reboredo-Rodríguez, P., Sanchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., Barreca, D., Pittala, V., Samec, D., Orhan, I.E., Gulcan, H.O., Forbes-Hernandez, T.Y., Battino, M., Nabavi, S.F., Devi, K.P., Nabavi, S.M., 2020. Evaluation of the status quo of polyphenols analysis: Part II-Analysis methods and food processing effects. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19, 3219–3240.

Sandra, D., Radha, M., Harishkumar, M., Yuichi, N., Sayuri, O., Masugi, M., 2010. Downregulation of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 by grape seed proanthocyanidin extract. *Phytomedicine* 17, 42–46.

Savage, B., Almus-Jacobs, F., Ruggeri, Z.M., 1998. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94, 657–666.

Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Rémésy, C., 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 56, 276–282.

Schaller, J., Gerber, S.S., 2011. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 785–801.

Scharf, R.E., 2018. Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: Part 2. *Hamostaseologie* 38, 211–222.

Schmaier, A.H., 2016. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *J. Thromb. Haemost.* 14, 28–39.

Schmidt, A.E., Bajaj, S.P., 2003. Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. *Trends Cardiovasc. Med.* 13, 39–45.

Schramm, D.D., Wang, J.F., Holt, R.R., Ensunsa, J.L., Gonsalves, J.L., Lazarus, S.A., Schmitz, H.H., German, J.B., Keen, C.L., 2001. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 73, 36–40.

Schreuder, M., Reitsma, P.H., Bos, M.H.A., 2019. Blood coagulation factor Va's key interactive residues and regions for prothrombinase assembly and prothrombin binding. *J. Thromb. Haemost.* 17, 1229–1239.

Seligsohn, U., 2009. Factor XI deficiency in humans. *J. Thromb. Haemost.* 7 Suppl 1, 84–87.

Seyedsadjadi, N., Grant, R., 2020. The Potential Benefit of Monitoring Oxidative Stress and Inflammation in the Prevention of Non-Communicable Diseases (NCDs). *Antioxidants (Basel)* 10.

Shantsila, E., Kamphuisen, P.W., Lip, G.Y.H., 2010. Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 8, 2358–2368.

Shi, Z.-H., Li, N.-G., Tang, Y.-P., Wei-Li, null, Lian-Yin, null, Yang, J.-P., Hao-Tang, null, Duan, J.-A., 2012. Metabolism-based synthesis, biologic evaluation and SARs analysis of O-methylated analogs of quercetin as thrombin inhibitors. *Eur J Med Chem* 54, 210–222.

Si, Hongwei, Wang, X., Zhang, Longyun, Parnell, L.D., Admed, B., LeRoith, T., Ansah, T.-A., Zhang, Lijuan, Li, J., Ordovals, J.M., Si, Hongzong, Liu, D., Lai, C.-Q., 2019. Dietary epicatechin improves survival and delays skeletal muscle degeneration in aged mice. *FASEB J* 33, 965–977.

Siedlecki, C.A., Wang, I.W., Higashi, J.M., Kottke-Marchant, K., Marchant, R.E., 1999. Platelet-derived microparticles on synthetic surfaces observed by atomic force microscopy and fluorescence microscopy. *Biomaterials* 20, 1521–1529.

Sikora, J., Markowicz-Piasecka, M., Broncel, M., Mikiciuk-Olasik, E., 2014. Extract of *Aronia melanocarpa*-modified hemostasis: in vitro studies. *Eur J Nutr* 53, 1493–1502.

Simos, Y.V., Verginadis, I.I., Toliopoulos, I.K., Velalopoulou, A.P., Karagounis, I.V., Karkabounas, S.C., Evangelou, A.M., 2012. Effects of catechin and epicatechin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, in vivo. *Redox Rep* 17, 181–186.

Sinegre, T., Milenkovic, D., Bourgne, C., Teissandier, D., Nasri, Y., Dannus, L.-T., Morand, C., Lebreton, A., 2020. Impact of Epicatechin on the Procoagulant Activities of Microparticles. *Nutrients* 12.

Sinegre, T., Milenkovic, D., Teissandier, D., Fully, P., Bourdin, J., Morand, C., Lebreton, A., 2021. Impact of epicatechin on fibrin clot structure. *Eur J Pharmacol* 893, 173830.

Sinegre, T., Teissandier, D., Milenkovic, D., Morand, C., Lebreton, A., 2019. Epicatechin influences primary hemostasis, coagulation and fibrinolysis. *Food Funct* 10, 7291–7298.

Siudut, J., Grela, M., Wypasek, E., Plens, K., Undas, A., 2016. Reduced plasma fibrin clot permeability and susceptibility to lysis are associated with increased risk of postthrombotic syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 14, 784–793.

Smith, S.A., 2009. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 19, 3–10.

Sporn, L.A., Chavin, S.I., Marder, V.J., Wagner, D.D., 1985. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* 76, 1102–1106.

Sprague, D.L., Elzey, B.D., Crist, S.A., Waldschmidt, T.J., Jensen, R.J., Ratliff, T.L., 2008. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* 111, 5028–5036.

Stalmach, A., Troufflard, S., Serafini, M., Crozier, A., 2009. Absorption, metabolism and excretion of Choldi green tea flavan-3-ols by humans. *Mol Nutr Food Res* 53 Suppl 1, S44-53.

Stefanini, L., Bergmeier, W., 2019. RAP GTPases and platelet integrin signaling. *Platelets* 30, 41–47.

Stefanini, L., Bergmeier, W., 2018. Negative regulators of platelet activation and adhesion. *J Thromb Haemost* 16, 220–230.

Stefanini, L., Bergmeier, W., 2010. CalDAG-GEFI and platelet activation. *Platelets* 21, 239–243.

Stevens, A., Lowe, J.S., 2002. *Histologie humaine*. De Boeck Université, Bruxelles.

Stump, D.C., Lijnen, H.R., Collen, D., 1986. Purification and characterization of a novel low molecular weight form of single-chain urokinase-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 261, 17120–17126.

Suades, R., Padró, T., Badimon, L., 2015. The Role of Blood-Borne Microparticles in Inflammation and Hemostasis. *Semin Thromb Hemost* 41, 590–606.

Sumaya, W., Wallentin, L., James, S.K., Siegbahn, A., Gabrysch, K., Bertilsson, M., Himmelmann, A., Ajjan, R.A., Storey, R.F., 2018. Fibrin clot properties

independently predict adverse clinical outcome following acute coronary syndrome: a PLATO substudy. *Eur. Heart J.* 39, 1078–1085.

Suzuki, J., Nagata, S., 2014. Phospholipid scrambling on the plasma membrane. *Meth. Enzymol.* 544, 381–393.

Tabibian, S., Shiravand, Y., Shams, M., Safa, M., Gholami, M.S., Heydari, F., Ahmadi, A., Rashidpanah, J., Dorgalaleh, A., 2019. A Comprehensive Overview of Coagulation Factor V and Congenital Factor V Deficiency. *Semin. Thromb. Hemost.* 45, 523–543.

Talebi, Marjan, Talebi, Mohsen, Farkhondeh, T., Mishra, G., İlgün, S., Samarghandian, S., 2021. New insights into the role of the Nrf2 signaling pathway in green tea catechin applications. *Phytother Res.*

Taubert, D., Roesen, R., Lehmann, C., Jung, N., Schömig, E., 2007. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA* 298, 49–60.

Thompson, R.E., Mandle, R., Kaplan, A.P., 1977. Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J. Clin. Invest.* 60, 1376–1380.

Thorelli, E., Kaufman, R.J., Dahlbäck, B., 1999. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood* 93, 2552–2558.

Tripodi, A., 2008. The history of phenotypic testing in thrombosis and hemostasis. *Semin. Thromb. Hemost.* 34, 585–592.

Tripodi, A., Chantarangkul, V., Mannucci, P.M., 2009. Acquired coagulation disorders: revisited using global coagulation/anticoagulation testing. *Br. J. Haematol.* 147, 77–82.

Undas, A., 2020. Altered fibrin clot properties and fibrinolysis in patients with atrial fibrillation: practical implications. *Europace* 22, 185–194.

Undas, A., 2016. How to Assess Fibrinogen Levels and Fibrin Clot Properties in Clinical Practice? *Semin. Thromb. Hemost.* 42, 381–388.

Undas, A., Nowakowski, T., Cieśła-Dul, M., Sadowski, J., 2011. Abnormal plasma fibrin clot characteristics are associated with worse clinical outcome in patients

with peripheral arterial disease and thromboangiitis obliterans. *Atherosclerosis* 215, 481–486.

Undas, A., Podolec, P., Zawilska, K., Pieculewicz, M., Jedliński, I., Stepień, E., Konarska-Kuszevska, E., Weglarz, P., Duszyńska, M., Hanschke, E., Przewlocki, T., Tracz, W., 2009. Altered fibrin clot structure/function in patients with cryptogenic ischemic stroke. *Stroke* 40, 1499–1501.

Valke, L.L.F.G., Bukkems, L.H., Barteling, W., Laros-van Gorkom, B.A.P., Blijlevens, N.M.A., Mathôt, R.A.A., van Heerde, W.L., Schols, S.E.M., 2020. Pharmacodynamic monitoring of factor VIII replacement therapy in hemophilia A: Combining thrombin and plasmin generation. *J Thromb Haemost* 18, 3222–3231.

van den Eijnden-Schrauwen, Y., Kooistra, T., de Vries, R.E., Emeis, J.J., 1995. Studies on the acute release of tissue-type plasminogen activator from human endothelial cells in vitro and in rats in vivo: evidence for a dynamic storage pool. *Blood* 85, 3510–3517.

van der Meijden, P.E.J., Heemskerk, J.W.M., 2019. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol* 16, 166–179. 0

van der Pol, E., Böing, A.N., Gool, E.L., Nieuwland, R., 2016. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost* 14, 48–56.

van der Pol, E., Coumans, F. a. W., Grootemaat, A.E., Gardiner, C., Sargent, I.L., Harrison, P., Sturk, A., van Leeuwen, T.G., Nieuwland, R., 2014. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost* 12, 1182–1192.

van der Zee, P.M., Biró, E., Ko, Y., de Winter, R.J., Hack, C.E., Sturk, A., Nieuwland, R., 2006. P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin. Chem.* 52, 657–664.

van Geffen, M., Loof, A., Lap, P., Boezeman, J., Laros-van Gorkom, B.A.P., Brons, P., Verbruggen, B., van Kraaij, M., van Heerde, W.L., 2011. A novel hemostasis assay for the simultaneous measurement of coagulation and fibrinolysis. *Hematology* 16, 327–336.

- van Schooten, C.J., Shahbazi, S., Groot, E., Oortwijn, B.D., van den Berg, H.M., Denis, C.V., Lenting, P.J., 2008. Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood* 112, 1704–1712.
- Varga-Szabo, D., Pleines, I., Nieswandt, B., 2008. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 403–412.
- Vauzour, D., 2017. Polyphenols and brain health. *OCL* 24, A202.
- Vazquez-Prieto, M.A., Bettaieb, A., Haj, F.G., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2012. (-)-Epicatechin prevents TNF α -induced activation of signaling cascades involved in inflammation and insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 527, 113–118.
- Verhamme, P., Hoylaerts, M.F., 2006. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg* 61, 213–219.
- Vilahur, G., Gutiérrez, M., Arzanauskaite, M., Mendieta, G., Ben-Aicha, S., Badimon, L., 2018. Intracellular platelet signalling as a target for drug development. *Vascul Pharmacol* 111, 22–25.
- Vilar, R., Fish, R.J., Casini, A., Neerman-Arbez, M., 2020. Fibrin(ogen) in human disease: both friend and foe. *Haematologica* 105, 284–296.
- Vogiatzoglou, A., Mulligan, A.A., Lentjes, M.A.H., Luben, R.N., Spencer, J.P.E., Schroeter, H., Khaw, K.-T., Kuhnle, G.G.C., 2015. Flavonoid Intake in European Adults (18 to 64 Years). *PLoS One* 10.
- von Känel, R., Meister, R.E., Stutz, M., Kummer, P., Arpagaus, A., Huber, S., Ehlert, U., Wirtz, P.H., 2014. Effects of dark chocolate consumption on the prothrombotic response to acute psychosocial stress in healthy men. *Thromb. Haemost.* 112, 1151–1158.
- Voukalis, C., Shantsila, E., Lip, G.Y.H., 2019. Microparticles and cardiovascular diseases. *Ann. Med.* 51, 193–223.
- Vu, T.T., Stafford, A.R., Leslie, B.A., Kim, P.Y., Fredenburgh, J.C., Weitz, J.I., 2013. Batroxobin binds fibrin with higher affinity and promotes clot expansion to a greater extent than thrombin. *J Biol Chem* 288, 16862–16871.

Wagner, D.D., Olmsted, J.B., Marder, V.J., 1982. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 95, 355–360.

Wang, X., Ouyang, Y.Y., Liu, J., Zhao, G., 2014. Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Br J Nutr* 111, 1–11.

Wang, X., Yang, Z., Su, F., Li, J., Boadi, E.O., Chang, Y.-X., Wang, H., 2020. Study on Structure Activity Relationship of Natural Flavonoids against Thrombin by Molecular Docking Virtual Screening Combined with Activity Evaluation In Vitro. *Molecules* 25.

Wang, Z.-T., Wang, Z., Hu, Y.-W., 2016. Possible roles of platelet-derived microparticles in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 248, 10–16.

Watson, S., Berlanga, O., Best, D., Frampton, J., 2000. Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets* 11, 252–258.

Weidmann, H., Heikaus, L., Long, A.T., Naudin, C., Schlüter, H., Renné, T., 2017. The plasma contact system, a protease cascade at the nexus of inflammation, coagulation and immunity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864, 2118–2127.

Weiler, H., Isermann, B.H., 2003. Thrombomodulin. *J. Thromb. Haemost.* 1, 1515–1524.

Weisel, J.W., 2005. Fibrinogen and fibrin. *Adv. Protein Chem.* 70, 247–299.

Weisel, J.W., Litvinov, R.I., 2017. Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell. Biochem.* 82, 405–456.

Wheeler, A.P., Gailani, D., 2016. Why Factor XI Deficiency is a Clinical Concern. *Expert Rev Hematol* 9, 629–637.

Williamson, G., Kay, C.D., Crozier, A., 2018. The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 17, 1054–1112.

Wiman, B., Collen, D., 1979. On the mechanism of the reaction between human alpha 2-antiplasmin and plasmin. *J. Biol. Chem.* 254, 9291–9297.

Wohner, N., Sótonyi, P., Machovich, R., Szabó, L., Tenekedjiev, K., Silva, M.M.C.G., Longstaff, C., Kolev, K., 2011. Lytic resistance of fibrin containing red blood cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 2306–2313.

Wolberg, A.S., 2007. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* 21, 131–142.

Woulfe, D., Jiang, H., Mortensen, R., Yang, J., Brass, L.F., 2002. Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets. *J Biol Chem* 277, 23382–23390.

Xu, H., Luo, J., Huang, J., Wen, Q., 2018. Flavonoids intake and risk of type 2 diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore)* 97.

Yan, R., Wang, Z., Yuan, Y., Cheng, H., Dai, K., 2009. Role of cAMP-dependent protein kinase in the regulation of platelet procoagulant activity. *Arch Biochem Biophys* 485, 41–48.

Yang, Q., Wang, G., Zhang, F., 2020. Role of Peripheral Immune Cells-Mediated Inflammation on the Process of Neurodegenerative Diseases. *Front Immunol* 11, 582825.

Yuana, Y., Oosterkamp, T.H., Bahatyrova, S., Ashcroft, B., Garcia Rodriguez, P., Bertina, R.M., Osanto, S., 2010. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost* 8, 315–323.

Zhang, M., Vervoort, L., Moalin, M., Mommers, A., Douny, C., den Hartog, G.J.M., Haenen, G.R.M.M., 2018. The chemical reactivity of (-)-epicatechin quinone mainly resides in its B-ring. *Free Radic Biol Med* 124, 31–39.

Zhang, X., McGeoch, S.C., Megson, I.L., MacRury, S.M., Johnstone, A.M., Abraham, P., Pearson, D.W.M., de Roos, B., Holtrop, G., O’Kennedy, N., Lopley, G.E., 2014. Oat-enriched diet reduces inflammatory status assessed by circulating cell-derived microparticle concentrations in type 2 diabetes. *Mol Nutr Food Res* 58, 1322–1332.

Zubairova, L.D., Nabiullina, R.M., Nagaswami, C., Zuev, Y.F., Mustafin, I.G., Litvinov, R.I., Weisel, J.W., 2015. Circulating Microparticles Alter Formation, Structure, and Properties of Fibrin Clots. *Sci Rep* 5, 17611.

Zwicker, J.I., Trenor, C.C., Furie, B.C., Furie, B., 2011. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 728–733.

Résumé en français

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus largement répandus dans le règne végétal. Ils sont également à l'origine de nombreux effets bénéfiques liés à l'alimentation notamment dans la santé cardiovasculaire. Parmi eux, l'épicatéchine, un flavonoïde de la famille des flavan-3-ols est connu pour ses propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires. L'hémostase, qui participe à la physiopathologie des maladies cardiométaboliques pourrait également être modulée par les flavonoïdes.

La première partie de ces travaux de thèse a consisté à étudier l'impact de l'épicatéchine sur les trois principales étapes de l'hémostase que sont l'hémostase primaire, la coagulation plasmatique et la fibrinolyse, grâce à des outils globaux, afin de tenter de dégager le phénotype hémostatique induit par l'épicatéchine. Nous avons pu montrer qu'à forte concentration l'épicatéchine inhibe la fonction plaquettaire et module le profil coagulant et fibrinolytique. Dans la deuxième partie, nous avons tenté de déterminer l'effet de l'épicatéchine sur les microparticules et leurs fonctions procoagulantes. Alors que la concentration globale en microparticules n'est pas impactée par l'épicatéchine, cette dernière semble atténuer leur potentiel procoagulant lorsqu'il est détecté par la formation de thrombine. Enfin dans la troisième partie, nous avons étudié le processus final de formation du caillot de fibrine. Par des techniques de microscopie, spectrophotométrique et fonctionnelle nous avons pu déterminer que le caillot formé en présence d'épicatéchine est moins dense et plus perméable.

Ces données *in vitro* restent encore à être confirmées *in vivo* afin d'objectiver l'impact de l'épicatéchine et de ses métabolites à des concentrations compatibles avec l'alimentation.

Titre en anglais

Impact of epicatechin on hemostasis and fibrin clot structure

Résumé en anglais

Flavonoids are the most widespread polyphenols in the plant kingdom. They are also associated to many of the beneficial effects of plant-based food and diet, especially in cardiovascular health. Among them, epicatechin, a flavonoid from the flavan-3-ols family is known for its antioxidant or anti-inflammatory properties and capacity to protect from a range of dysfunctions related to chronic diseases. Hemostasis, which contributes to the pathophysiology of cardiometabolic diseases, could also be modulated by flavonoids.

The first part of this thesis was to study the impact of epicatechin on the three main stages of hemostasis which are primary hemostasis, plasma coagulation and fibrinolysis, using global tools to identify the hemostatic phenotype induced by epicatechin. We have shown that epicatechin at high concentration inhibits platelet function and modulates the coagulant and fibrinolytic profile. In the second part, we tried to determine the effect of epicatechin on microparticles and their procoagulant functions. While the overall microparticle concentration is not impacted by epicatechin, the latter appears to attenuate their procoagulant potential when detected by the formation of thrombin. Finally in the third part, we studied the final process of fibrin clot formation. Using microscopy, spectrophotometric and functional techniques, we were able to determine that the clot formed in the presence of epicatechin is less dense and more permeable.

These *in vitro* data have yet to be confirmed *in vivo* to objectify the impact of epicatechin and its metabolites at concentrations reachable through dietary intakes.

Adresse du laboratoire d'accueil

INRAE – UMR1019 - Nutrivasc
63122 SAINT-GENES-CHAMPANELLE