



HAL
open science

Apport du test de génération de thrombine dans différents modèles d'hypercoagulabilité et de dysfonction endothéliale.

Paul Billoir

► To cite this version:

Paul Billoir. Apport du test de génération de thrombine dans différents modèles d'hypercoagulabilité et de dysfonction endothéliale.. Biologie moléculaire. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR108 . tel-03657057

HAL Id: tel-03657057

<https://theses.hal.science/tel-03657057v1>

Submitted on 2 May 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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Apport du test de génération de thrombine dans différents modèles d'hypercoagulabilité et de dysfonction endothéliale.

**Présentée et soutenue par
PAUL BILLOIR**

**Thèse soutenue le 13/12/2021
devant le jury composé de**

M. PHILIPPE NGUYEN	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE	Rapporteur du jury
MME VÉRONIQUE REGNAULT	DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE NANCY 1 HENRI POINCARÉ	Rapporteur du jury
M. JEREMY BELLIN	PUPH DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. LUC DARNIGE	, UNIVERSITE PARIS 5 UNIVERSITE PARIS DESC	Membre du jury
MME PASCALE GAUSSEM	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE PARIS 5 UNIVERSITE PARIS DESC	Membre du jury
MME VÉRONIQUE LE CAM- DUCHEZ	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. YGAL BENHAMOU	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse

**Thèse dirigée par VÉRONIQUE LE CAM-DUCHEZ et YGAL BENHAMOU,
ENDOTHELIUM, VALVULOPATHIES ET INSUFFISANCE CARDIAQUE**



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de « Université Rouen Normandie »

Apport du test de génération de thrombine dans différents modèles d'hypercoagulabilité et de dysfonction endothéliale

**Présentée et soutenue par
Paul BILLOIR**

**Thèse soutenue publiquement le (date de soutenance)
devant le jury composé de**

Dr Véronique Regnault	DR HDR- Université Lorraine	Rapporteur
Pr Phillipe Nguyen	PUPH- Université Reims	Rapporteur
Pr Pascale Gaussem	PUPH- Université Paris Descartes	Examineur
Dr Luc Darnige	PH- Hôpital Européen George Pompidou	Examineur
Dr Véronique Le Cam Duchez	PH-HDR-CHU Charles Nicolle	Codirecteur de thèse
Pr Ygal Benhamou	PUPH- Université Rouen Normandie	Codirecteur de thèse
Pr Jérémy Bellien	PUPH- Université Rouen Normandie	Directeur de laboratoire

**Thèse dirigée par Véronique Le Cam Duchez et Ygal Benhamou, laboratoire UMRS INSERM U1096
Endothélium Valvulopathie Insuffisance cardiaque**



Inserm U1096
Endothelium, Valvulopathy & Heart Failure

Sommaire

Table des matières

Sommaire.....	1
Liste des figures	6
Liste des tableaux	8
Liste des abbréviations.....	9
Résumé.....	12
INTRODUCTION.....	13
I- Les cellules endothéliales	14
1- Structure de la paroi vasculaire	14
1.1. <i>L'adventice</i>	14
1.2. <i>La média</i>	14
1.3. <i>L'intima</i>	14
2- Fonctions de l'endothélium	15
2.1. <i>Contrôle de la circulation sanguine</i>	16
2.2 <i>Régulation de l'hémostase</i>	16
2.2.1. Physiologie de la coagulation	17
2.2.2. Hémostase primaire	17
2.2.3. La coagulation	18
2.2.3.1. La voie endogène	18
2.2.3.2. La voie exogène.....	19
2.2.3.3. Formation de fibrine	20
2.3. <i>Inhibition de l'hémostase</i>	20
2.3.1. Contrôle de l'hémostase primaire	20
2.3.2. Contrôle de la coagulation	21
2.3.3. Contrôle de la fibrinolyse	21
2.4. <i>Contrôle de l'inflammation</i>	21
2.5. <i>Contrôle de la perméabilité vasculaire</i>	23
3. Les progéniteurs endothéliaux circulants	23
3.1. <i>Origine des progéniteurs endothéliaux circulants</i>	23
3.2. <i>Mobilisation des progéniteurs endothéliaux</i>	23
4. Le glycocalyx.....	25

II- Dysfonction endothéliale et hypercoagulabilité.....	26
1. Syndrome des antiphospholipides.....	27
1.1. Généralités	27
1.1.1. Syndrome des antiphospholipides thrombotique.....	28
1.1.2. Syndrome des antiphospholipides obstétrical	29
1.1.3. Porteurs asymptomatiques d'anticorps antiphospholipides.....	29
1.2. Physiopathologie du syndrome des antiphospholipides.....	30
1.2.1. Anticorps antiphospholipides	30
1.2.1.1. Le lupus anticoagulant	30
1.2.1.2. Les anticorps anticardiolipine.....	31
1.2.1.3. Les anticorps anti-β-2-glycoprotéine I	31
1.2.2. SAPL et hémostase.....	31
1.2.2.1. Le facteur tissulaire	31
1.2.2.2. Inhibition de la protéine C activée	32
1.2.2.3. Inhibition de l'activité de l'annexine A5.....	32
1.2.2.4. Inhibition du tissue factor pathway inhibitor	32
1.2.2.5. Inhibition de la fibrinolyse	33
1.2.3. Diminution de la production de NO.....	33
1.2.4. Hyperactivation du complément.....	33
1.3. Traitement du SAPL	35
1.3.1. Thrombose artérielle et veineuse	35
1.3.1.1. Prévention primaire	35
1.3.1.2. Prévention secondaire	35
1.3.2. SAPL obstétrical.....	36
1.3.3. Hydroxychloroquine.....	36
2. Fibrose pulmonaire idiopathique	37
2.2. Epidémiologie	37
2.3. Symptomatologie et évolution clinique.....	37
2.2.1. Emphysème	38
2.2.2. Cancer du poumon.....	38
2.2.3. Evènement thrombo-embolique	38
2.2.4. Maladie coronarienne.....	38
2.3. Physiopathologie.....	39
2.4. Hypercoagulabilité au cours de la fibrose pulmonaire idiopathique	41
2.5. Traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique	42

2.5.1. Traitement non médicamenteux	42
2.5.1.1. Oxygénothérapie.....	42
2.5.1.2. Réhabilitation pulmonaire.....	43
2.5.1.3. Transplantation pulmonaire.....	43
2.5.2. <i>Traitement pharmacologique</i>	43
2.5.2.1. Nintedanib.....	43
2.5.2.2. Pirfenidone.....	43
2.5.2.3. Treprostinil.....	44
3. Infection à SARS-CoV-2.....	44
3.1. Physiopathologie	44
3.1.1. Endothélium et COVID-19.....	44
3.1.2. Réponse immunitaire et atteinte tissulaire	45
3.2. COVID-19 et thrombose	46
3.2.1. Thrombose veineuse.....	46
3.2.2. Thrombose artérielle.....	46
3.3. Prédiction d'aggravation aux cours du COVID-19	47
III- Le test de génération de thrombine.....	47
1. Principe du test de génération de thrombine.....	48
2. Mesure et correction du logiciel	49
2.1. <i>Correction de l'effet filtre</i>	49
2.2. <i>Dérivée primaire de fluorescence corrigée</i>	49
2.3. <i>Correction de l'activité $\alpha 2M$/thrombine</i>	49
3. Aspect méthodologique	51
3.1. <i>Le type de tube</i>	51
3.2. <i>La concentration en FT</i>	51
3.3. <i>La concentration en PL</i>	52
3.4. <i>Evaluation de la RPCa</i>	52
IV-TGT et dysfonction endothéliale	52
1. Modèle clinique d'évaluation de la dysfonction endothéliale par le TGT	52
1.1. <i>Facteurs de risque de thrombose et TGT</i>	52
1.1.1. Thrombose veineuse	52
1.1.1.1. Vieillesse.....	52
1.1.1.2. Obésité	52
1.1.1.3. Développement de la thrombose	53
1.1.1.4. Thrombose récidivante	53

1.1.2. Thrombose artérielle et facteurs de risque cardiovasculaire	54
2.1.2.1 Diabète	54
2.1.2.2. Thrombose artérielle	54
1.2. <i>Maladie auto-immune</i>	55
1.2.1. TGT et syndrome des antiphospholipides	55
1.2.2. <i>TGT et Lupus Erythémateux Systémique</i>	56
1.2.3. <i>TGT et polyarthrite rhumatoïde</i>	56
1.2.4. <i>TGT et vascularites</i>	57
1.2.5. <i>TGT et thrombocytopénie immunologique</i>	58
Objectif	59
I. Modèles cellulaire et animal de dysfonction endothéliale	61
1. Modèles cellulaires de dysfonctions endothéliales	61
1.1. <i>Cellules endothéliales aortiques</i>	61
1.1.1. <i>Culture de cellules endothéliales aortiques</i>	61
1.1.2. <i>Traitement des cellules endothéliales aortiques</i>	61
1.1.3. <i>Test de génération de thrombine sur HAEC</i>	61
1.1.4. <i>Etude de l'expression de la thrombomoduline et ePCR par cytométrie</i>	61
1.2. <i>Endothelial colony-forming cells</i>	62
1.2.1. <i>Isolement et culture d'ECFC</i>	62
1.2.2. <i>Exploration des propriétés procoagulantes des ECFC par TGT</i>	62
1.2.3. <i>Etude de la prolifération cellulaire par différents traitements</i>	63
1.2.3.1. <i>Quantification par comptage cellulaire</i>	63
1.2.3.2. <i>Quantification par mesure de l'activité pNPP</i>	63
2. Modèle murin de SAPL.....	64
2.1. <i>Purification des IgG</i>	64
2.2. <i>Préparation de l'hydroxychloroquine</i>	65
2.3. <i>Préparation des souris et recueil des échantillons</i>	65
2.4. <i>Test de génération de thrombine sur le modèle murin de SAPL</i>	65
II- Populations étudiées	66
1. Populations étudiées.....	66
1.1. <i>Patients SAPL</i>	66
1.1.1. <i>Inclusion de patient SAPL</i>	66
1.1.2. <i>Recherche d'un Lupus anticoagulant</i>	67
1.1.3. <i>Dosage des anti-β2GPI et ACL</i>	67
1.1.4. <i>Test de génération de thrombine sur patients SAPL</i>	67

1.3.1 Inclusion de patients COVID19	68
1.3.2. Descriptifs des données recueillis	69
1.3.3. Marqueurs d'hypercoagulabilités étudiés	69
1.4. Pool témoin.....	69
ARTICLES ET DISCUSSION.....	70
Manuscrit numéro 1	71
Manuscrit numéro 2	80
Manuscrit numéro 3	88
Manuscrit numéro 4	104
Manuscrit numéro 5	113
Manuscrit numéro 6	124
Discussion.....	138
1. Limites du TGT	138
1.1. Limites préanalytiques.....	138
1.2. Limites analytiques	138
1.2.1. Traitements anticoagulants	138
1.2.1.1. Héparine non fractionnée/Héparine de bas poids moléculaire.....	138
1.2.1.2. Anticoagulant oraux.....	139
1.2.2. Protéine C activée.....	140
2. Comparaison avec les autres marqueurs d'hypercoagulabilités	140
2.1. D-dimères.....	140
2.2. Fragments 1+2 de la prothrombine	141
Conclusion et perspectives	143
Références bibliographiques.....	144

Liste des figures

Figure 1. Structure de la paroi vasculaire (Corbett, 1995)

Figure 2. Régulation homéostatique du flux sanguin, de l'hémostase de la perméabilité et de l'inflammation par les cellules endothéliales (Pierce R, Pediatrics, 2017)

Figure 3. Schéma général de la coagulation

Figure 4. Activation plaquettaire

Figure 5. Cascade de la coagulation

Figure 6. Vue schématique de la cascade d'adhésion des monocytes.

Figure 7. Conformation de la β 2 glycoprotéine I

Figure 8. Physiopathologie du syndrome des antiphospholipides

Figure 9. Physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique

Figure 10. Compartiment alvéolaire dans la fibrose pulmonaire idiopathique

Figure 11. Calibrated automated thrombinogram

Figure 12. Méthodologie de la génération de thrombine

Figure 13. Paramètres du thrombinogramme

Figure 14. Profil de coagulation avec le test de génération de thrombine

Figure 15. Mise au point du TGT sur plasma de souris

Figure 16. Etude de prolifération des ECFC incubés avec les différents traitements de la fibrose pulmonaire idiopathique

Figure 17. Augmentation du TGT pour les ECFC incubés avec les différents traitements de la fibrose pulmonaire idiopathique

Figure 18. Courbe ROC prédisant la survenue d'un événement thrombotique chez les patients COVID19.

Figure 19. Résultats du TGT de l'étude COVIDTHELIUM. Comparaison entre les patients qui s'aggravent et ne s'aggravent pas.

Liste des tableaux

Tableau 1. Distinction entre les MACs et les ECFCs

Tableau 2. Critères de classification de Sydney

Tableau 3. Critères du score GAPSS

Tableau 4. Caractéristiques cliniques des patients SAPL dont les IgG ont été purifiés

Tableau 5. Différentes concentrations de FT et PL utilisées

Liste des abréviations

α2M	Alpha-2-macroglobuline
ACC	Anticoagulant circulant
aCL	Anticardiolipine
ADP	Adénosine di phosphate
AMP	Adenosine monophosphate
Anti-β2GPI	Anti bêta-2-glycoprotéine I
aPL	Antiphospholipides
apoER2	Récepteur de l'apolipoprotéine E2
AT	Antithrombine
AVK	Anti vitamine K
BMI	Body mass index
CE	Cellules endothéliales
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CML	Cellules musculaires lisses
COVID-19	COrona-VIrus Disease 2019
ECFC	Endothelial colony forming cell
EPCR	Endothelial protein C receptor
ET	Endotheline
ETP	Endogenous thrombin potential
FII	Prothrombine
FIIa	Thrombine
FPI	Fibrose pulmonaire idiopathique
FV	Facteur V
FII	Facteur VII
FVIII	Facteur VIII
FIX	Facteur IX
FT	Facteur Tissulaire
FX	Facteur X
FXI	Facteur XI
FXII	Facteur XII
GAG	Glucosaminoglycanes
GP	Glycoprotéine

GCX	Glycocalyx
HCQ	Hydroxychloroquine
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukine
INR	International normalized ratio
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire
LA	Lupus anticoagulant
LES	Lupus érythémateux systémique
MAC	Myeloid angiogenic cell
MTEV	Maladie thrombo-embolique veineuse
MV	Microvésules
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Nitric oxyde synthetase
PAF	Platelet activating factor
PAI-1	Plaminogene activator inhibitor 1
PAR	Protease activated receptor
PCa	Protéine C activée
PEC	Progéniteur endothéliaux circulants
PECAM	Platelet endothelial adhesin molecule
PGI2	Prostacycline
PK	Prékalicréine
PL	Phospholipides
PPP	Plasma pauvre en plaquette
PRP	Plasma riche en plaquettes
PS	P-sélectine
PSGL1	Ligand glycoprotéique 1 de la P-sélectine
RPCA	Résistance à la protéine C activée
SAPL	Syndrome des antiphospholipides
SCA	Syndrome coronarien aigue
SRAS	Syndrome respiratoire aigue sévère
TCA	Temps de céphaline avec activateurs
TAFI	Tissue activable fibrinolysis inhibitor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TGF	Facteur de croissance transformant

TGT	Test de génération de thrombine
TM	thrombomoduline
TNF	Tumor necrosis factor
tPA	Tissular plasminogene activator
TQ	Temps de Quick
TXA	Thromboxane A2
uPA	Urokinase
vWF	Facteur Von Willebrand

Résumé

Ce travail a permis d'évaluer l'apport du test de génération de thrombine dans des modèles de cultures cellulaires, dans un modèle murin de SAPL, et chez des patients atteints d'une dysfonction endothéliale entraînant un état d'hypercoagulabilité. Les anticorps antiphospholipides entraînent une diminution de l'ePCR, induisant résistance à la protéine C activée, retrouvée dans nos différents modèles et patients. Le traitement par l'hydroxychloroquine dans le modèle expérimental de SAPL, a montré un effet protecteur de ce traitement sur la fonction endothéliale, en restaurant la vasorelaxation et une normalisation de la génération de thrombine après injection d'anticorps antiphospholipides purifiés. Il a été démontré un état hypercoagulable, associé au développement d'embolie pulmonaire, au cours de la fibrose pulmonaire idiopathique. Les progéniteurs endothéliaux circulants de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, induisent un état d'hypercoagulabilité, associé à une hypoexpression de thrombomoduline. Ces résultats ouvrent une piste thérapeutique. Actuellement des essais cliniques testent la thrombomoduline comme thérapeutique potentielle. Récemment, une pandémie par Sars-CoV-2, est associée à un état hypercoagulable, avec le développement de thromboses multiples, retrouvées lors d'autopsies de patients. Nous avons démontré l'intérêt du test de génération de thrombine comme facteur pronostique au cours de l'infection à Sars-CoV-2, prédisant l'hospitalisation en réanimation des patients. Le test de génération de thrombine semble être un outil intéressant au cours de l'atteinte endothéliale induisant une hypercoagulabilité dans des modèles transversaux, et laisse entrevoir de possibles pistes thérapeutiques, comme la modulation du glycocalyx dans le SAPL.

INTRODUCTION

I- Les cellules endothéliales

1- Structure de la paroi vasculaire

Les vaisseaux sanguins de l'organisme sont constitués de trois couches ou tuniques concentriques et leurs proportions varient selon les catégories vasculaires (Figure 1). Ces couches sont appelées respectivement : l'adventice (couche externe), la média (couche moyenne) et l'intima (couche interne).

1.1. L'adventice

Elle est constituée de fibres lâches de collagène, de quelques fibres élastiques épaisses et de fibroblastes orientés longitudinalement. Elle contient un réseau appelé vasa vasorum, formant la paroi des artères et des veines, et permettant le bon positionnement dans l'environnement. Un second réseau, constitué de nerf (le nervi vasorum), a pour rôle principal l'innervation des cellules musculaires lisses.

1.2. La média

Contient des constituants extracellulaires (fibres élastiques, fibrilles d'élastine, fibres et fibrilles de collagène et des protéoglycanes) et exclusivement des cellules musculaires lisses (CML) dont la principale fonction est le maintien du tonus et la résistance vasculaire.

1.3. L'intima

Aussi appelé endothélium. L'endothélium est une monocouche cellulaire recouvrant la totalité des systèmes vasculaires. Les cellules endothéliales (CE) possèdent de grands axes qui sont orientés longitudinalement et soutenus par une couche sous-jacente mince de tissu conjonctif lâche.

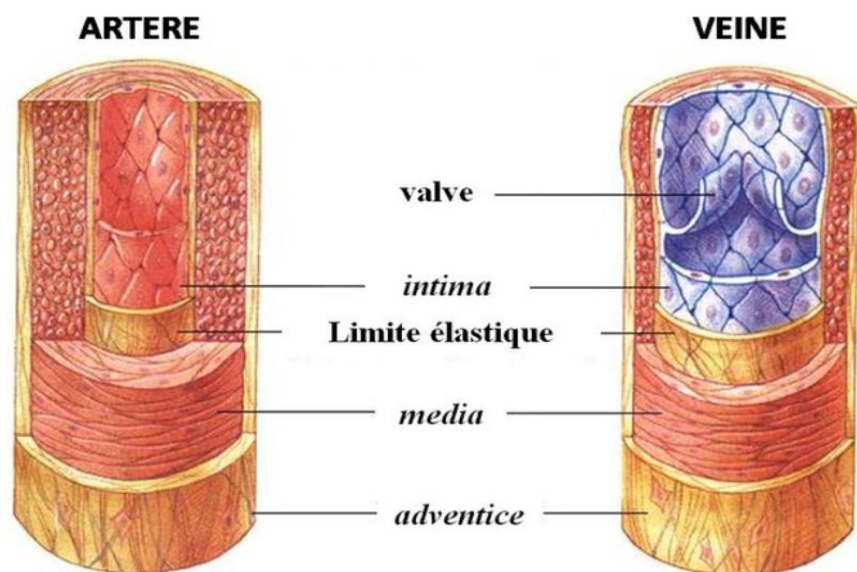


Figure 1. Structure de la paroi vasculaire (Corbett, 1995)

2- Fonctions de l'endothélium

Le flux sanguin exerce sur les CE un flux laminaire, formé de couches concentriques parallèles. Cette force de friction est appelée force de cisaillement (ou shear stress) (1), elle va stimuler la production par la CE de facteurs inhibant la coagulation, favorisant la vasoconstriction ou la vasodilatation et le remodelage vasculaire (2) (Figure 2).

L'hétérogénéité des fonctions endothéliales explique leur implication dans de nombreuses pathologies. L'endothélium assure en effet le contrôle du tonus vasculaire, de la migration trans-endothéliale des leucocytes régulant ainsi l'inflammation, de la perméabilité vasculaire et de la coagulation. Il a également un rôle anti-oxydant et régule la croissance cellulaire.

L'endothélium interagit directement avec le sang et le sous endothélium, ce qui permet différentes régulations homéostatiques (Figure 2):

- Sécrétion de substances vaso-actives (monoxyde d'azote (NO), prostacycline, l'endothéline,...)
- Régulation de l'hémostasie
- Perméabilité vasculaire permettant les échanges O₂/CO₂
- Recrutement de cellules inflammatoires par adhésion et sécrétion de chimiokines
- Initiation de l'angiogénèse

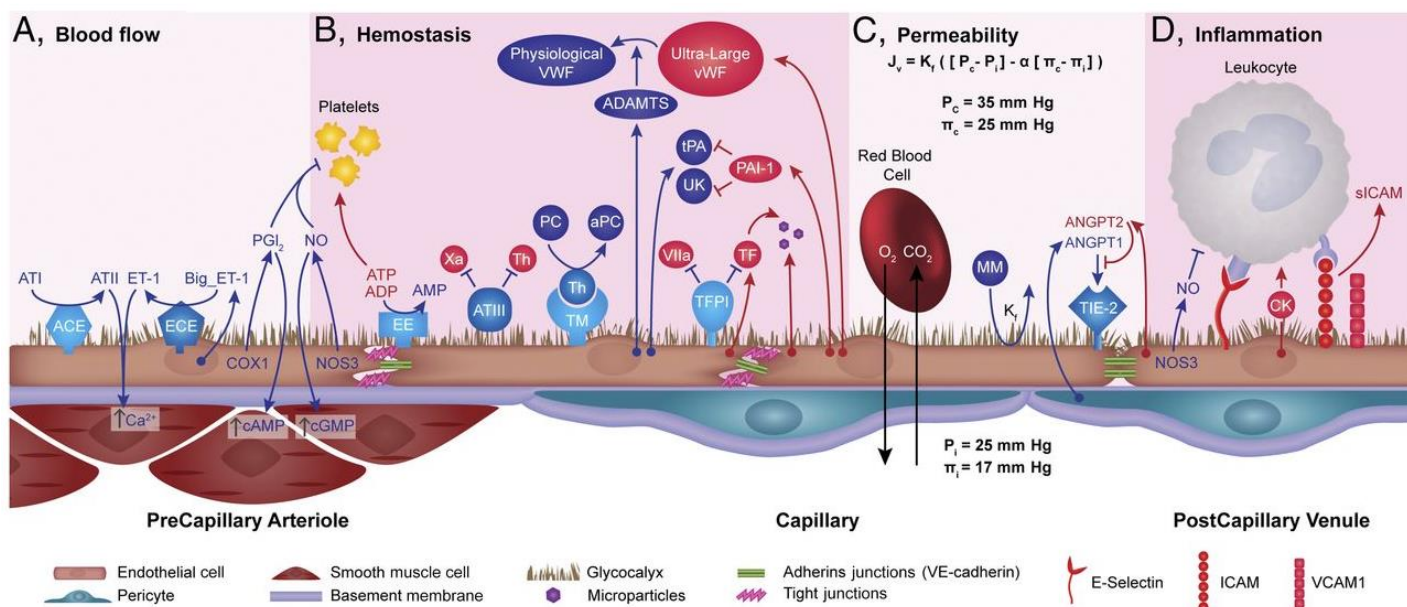


Figure 2. Régulation homéostatique du flux sanguin, de l'hémostasie de la perméabilité et de l'inflammation par les cellules endothéliales (Pierce R, Pediatrics, 2017) (3)

2.1. Contrôle de la circulation sanguine

La variation de l'hémodynamique vasculaire est sous la dépendance de nombreux médiateurs sécrétés par les CE. Physiologiquement, elles vont réguler le flux sanguin et la pression sanguine en libérant des molécules vasodilatatrices, comme le NO ou la prostacycline (PGI₂), et des molécules vasoconstrictrices, comme l'endothéline-1 et le platelet-activating factor.

Le NO est un radical libre synthétisé lors de l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline par l'oxyde nitrique synthetase (NOS). L'endothéliale oxyde nitrique synthetase (eNOS) est active de manière constitutive mais de nombreux composés augmente son activité : la thrombine, la bradykinine, l'adénosine 5'-diphosphate (ADP), les agonistes des récepteurs muscariniques ainsi que les forces de cisaillement.

Le NO va exercer différents rôles au sein du vaisseau :

- Une inhibition de l'activation plaquettaire
- Une inhibition du rolling et de l'adhésion leucocytaire
- Une induction de la migration et de la prolifération des cellules musculaires lisses
- Un maintien du tonus basal par relaxation des cellules musculaires lisses

L'endothéline-1 exerce une action opposée au NO. C'est le plus puissant agent vasoconstricteur. Sa synthèse passe par l'intermédiaire d'un propeptide, dont la stimulation est induite par les forces de cisaillement, l'hypoxie et l'ischémie. Elle entraîne la contraction des cellules musculaires lisses après action sur son récepteur endothéline A (ET-A), par augmentation du calcium intracellulaire et activation de la protéine kinase C. Elle stimule aussi la prolifération cellulaire avec un effet à long terme par accumulation du calcium en intracellulaire. L'endothéline-1 a un second récepteur présent sur les CE, ET-B, qui est impliqué dans la sécrétion du NO et de la PGI₂ (4).

Dans une moindre mesure, la prostacycline et le platelet-activating factor (PAF) vont réguler le tonus vasculaire. La prostacycline permet la relaxation des cellules musculaires lisses, en augmentant l'AMPc et en inhibant l'agrégation plaquettaire. Sa synthèse est induite par une augmentation des forces de cisaillement, et joue un rôle comme médiateur de l'inflammation (5). Le platelet-activating factor est un puissant médiateur phospholipidique. Il est localisé à la surface des CE et induit l'agrégation plaquettaire. Son rôle, comme médiateur de l'inflammation, intervient dans l'adhésion des leucocytes sur la paroi vasculaire (6)

2.2 Régulation de l'hémostase

La fonction principale de l'endothélium est de faciliter la circulation sanguine en présentant une surface antithrombotique. Sous l'effet de facteurs extrinsèques mécaniques ou chimiques, l'endothélium peut devenir procoagulant.

2.2.1. Physiologie de la coagulation

L'hémostase est l'ensemble des phénomènes physiologiques participant à la prévention ou à l'arrêt du saignement. La présence d'une brèche vasculaire, qui provoque une discontinuité de l'endothélium et l'exposition du sous endothélium, va induire la formation d'un clou plaquettaire (Figure 3), suivie de la coagulation plasmatique faisant intervenir des facteurs activateurs et inhibiteurs participant à la formation du thrombus et enfin, un phénomène retardé qui est la cicatrisation.

Pour assurer ces différents mécanismes, des interactions sont nécessaires entre le vaisseau, les CE, les plaquettes, les protéines de la coagulation et le système fibrinolytique permettant la dissolution du caillot.

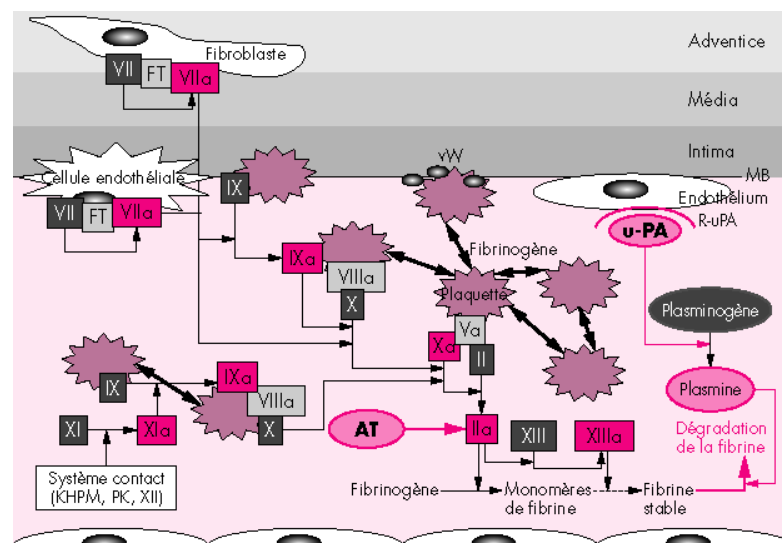


Figure 3. Schéma général de la coagulation

2.2.2. Hémostase primaire

Lorsque l'endothélium est lésé, un relargage par les CE, d'adrénaline, de noradrénaline et de sérotonine, va induire une vasoconstriction reflexe. Ce « temps vasculaire » va être suivi d'un « temps plaquettaire » qui représente la phase d'activation des plaquettes (Figure 4). Dans un premier temps, on observe la phase d'adhésion plaquettaire, par liaison aux composés sous-endothéliaux, et en particulier au collagène, soit directement par les glycoprotéines (GP) Ia et VI, soit indirectement par liaison du facteur Willebrand (vWF) au complexe GPIb-IX-V plaquettaire. Le vWF est synthétisé par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes, et circule sous forme de multimères. Après leur adhésion, les plaquettes sont alors activées et sécrètent leur contenu granulaire, comme l'ADP et de nombreuses protéines impliquées dans l'angiogenèse. Elles génèrent du thromboxane A2 (TXA2) à travers le métabolisme des prostaglandines. C'est la phase sécrétoire. L'ADP provoque l'activation d'autres plaquettes. Le TXA2 a une action vasoconstrictrice et va amplifier l'agrégation plaquettaire.

Les différents agonistes vont induire l'adhésion et le recrutement de plaquettes circulantes. La formation du clou plaquettaire permet l'arrêt transitoire du saignement dans les capillaires sanguins. L'agrégation plaquettaire nécessite la présence de fibrinogène qui assure la constitution de ponts interplaquettaires par liaison à son récepteur la GPIIb/IIIa (7). Le réarrangement des phospholipides (PL) de surface associé à la formation des premières traces de fibrine va permettre une interaction entre les plaquettes, rendant l'agrégation irréversible. L'obturation de la brèche vasculaire par le clou plaquettaire est la finalité de l'hémostase primaire (8).

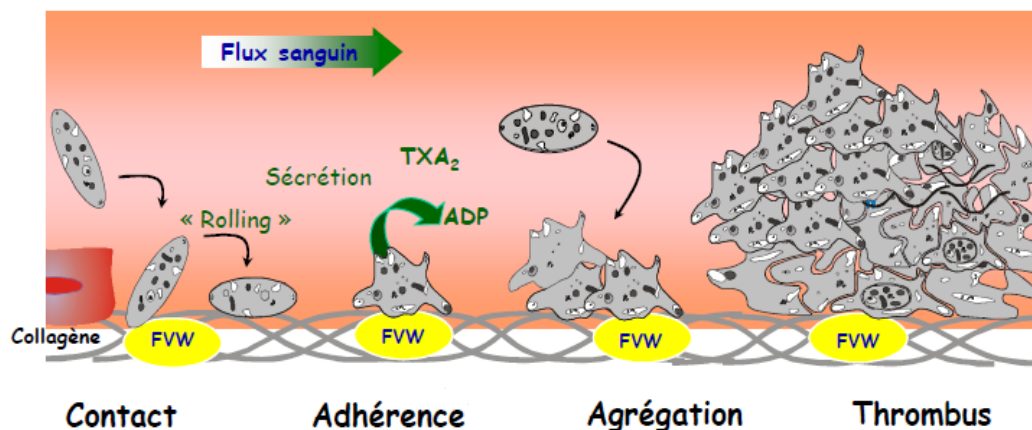


Figure 4. Activation plaquettaire

2.2.3. La coagulation

La coagulation est un ensemble de réactions enzymatiques permettant d'aboutir à une protéine insoluble conduisant à la formation du caillot, la fibrine. L'ensemble des facteurs participant à la coagulation, sauf les facteurs V et VIII, sont des zymogènes de sérine protéase. Ces différents facteurs sont synthétisés par le foie et les facteurs II, VII, IX, X sont vitamine K dépendants. Les facteurs vitamine K dépendants subissent une gamma-carboxylation des résidus glutamiques dans l'hépatocyte. Grâce à cette γ -carboxylation des résidus Glu, ces facteurs auront la faculté de se lier aux PL membranaires. Les différents facteurs de la coagulation vont de plus, induire une boucle d'amplification et d'activation des autres facteurs. La thrombine stimule l'activation des plaquettes, de nombreuses enzymes de la coagulation et leurs cofacteurs. Elle stimule également l'effet procoagulant des CE.

2.2.3.1. La voie endogène

La présence d'une brèche vasculaire va mettre en évidence une surface à charge électrique négative qui permet l'initiation de la phase "contact". Le kininogène de haut poids (KHPM) circulant se fixe sur

une surface activatrice (sous endothélium ou plaquettes activées) et permet la fixation du facteur XII (FXII) et de la prékallitréine (PK). La liaison du facteur XII induit une modification conformationnelle permettant l'activation de la PK en kallitréine, qui par un jeu d'hydrolyse et de rétrocontrôle positif va convertir et activer le facteur XII en FXIIa. L'activité sérine protéase du FXIIa clive le facteur XI et celui-ci devient actif (FXIa). Le FXI est le seul facteur de la coagulation à se présenter comme un homodimère avec un domaine Apple indispensable à la liaison avec le Gp1b plaquettaire, le facteur IX et le KHPM (9). Le FXIa va à son tour, par l'intermédiaire de son domaine Apple, interagir avec le facteur IX (FIX) et l'activer. La présence de résidu *gla* obtenu par la γ -carboxylation du FIX est indispensable au bon fonctionnement du FIX activé et permet des interactions avec les PL (plaquettaires, endothéliaux ou monocytaires) par liaison calcique, et le facteur X (FX). La présence des premières traces de thrombine active le facteur VIII en FVIIIa, qui se lie au FIX activé par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes et amplifie l'activité du FIX. Le complexe formé par le FVIIIa, le FIXa, les PL et le calcium, est appelé tenase et permet l'activation du FX en FXa.

La formation du deuxième complexe enzymatique de la coagulation, la prothrombinase, va aboutir à l'activation de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). Ce complexe est formé du FXa, de PL, de Ca^{2+} et du facteur V activé (FVa). Le Facteur V (FV) est dépourvu d'activité enzymatique comme le FVIII, mais il est le cofacteur du FXa en amplifiant son activité. Le FV est activé par les premières traces de thrombine, comme le FVIII.

2.2.3.2. La voie exogène

La mise à nu du sous endothélium va s'accompagner d'un relargage de Facteur Tissulaire (FT) dans la circulation sanguine et entraîner une activation du facteur VII (FVIIa) (10). Le FVIIa va directement activer le facteur X qui rejoint la voie commune pour former le complexe prothrombinase et permettre de produire le FIIa. La formation de FIIa par la voie exogène s'accompagne d'un rétrocontrôle positif et d'une boucle d'amplification de la coagulation (Figure 5). L'activité procoagulante du FT est accélérée par l'exposition de phospholipides anioniques à la surface des CE, qui a lieu lors de l'apoptose. *In vitro*, la synthèse du FT peut être induite par la thrombine, des endotoxines, les forces de cisaillement, l'hypoxie, des lipoprotéines oxydées et encore d'autres facteurs. *In vivo*, l'expression du FT est induite rapidement après une lésion vasculaire et du FT est retrouvé au niveau des plaques d'athérosclérose et des vaisseaux dérivés des tumeurs. Le FT participerait également à la régulation de l'angiogenèse. L'activation du récepteur à la thrombine PAR-1 (protease-activated receptor-1) induit la production et l'amplification de molécules prothrombotiques (11)

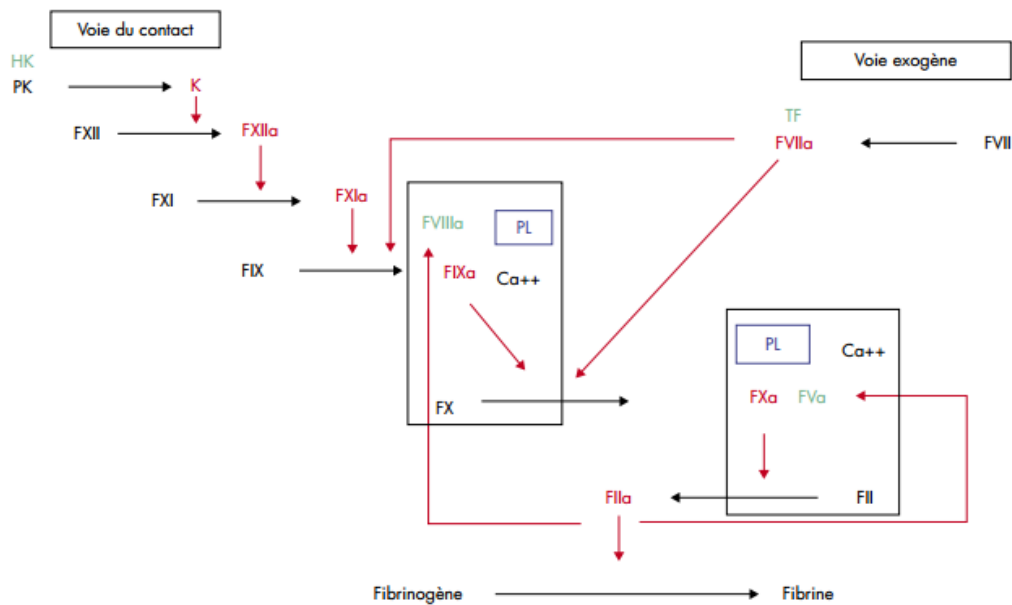


Figure 5. Cascade de la coagulation

2.2.3.3. Formation de fibrine

Le fibrinogène est une GP de 340 kDA, constituée de deux sous unités, chacune d'elles comportent trois chaînes polypeptidiques ($A\alpha$, $B\beta$ et γ). Ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Le fibrinogène comporte un domaine central E et deux domaines latéraux D. La thrombine clive le fibrinogène au niveau de l'exosite 1 et libère le fibrinopeptide A et B (12). La formation de fibrine insoluble commence par une torsion du double brin et les molécules de fibrine s'entrecroisent et se chevauchent. De manière concomitante, la thrombine active le facteur XIII en FXIIIa. Le FXIIIa en présence de Ca^{2+} va créer des liaisons covalentes entre les chaînes γ de fibrine et permettre la stabilisation du caillot de fibrine, empêchant l'hémorragie (13).

2.3. Inhibition de l'hémostase

2.3.1. Contrôle de l'hémostase primaire

A l'état quiescent, les CE inhibent l'interaction des plaquettes, en partie sous l'effet du NO et de la PGI₂. Le NO inhibe l'adhésion, l'activation, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire et favorise leur désagrégation par un mécanisme dépendant du GMPc. La PGI₂ agit en synergie avec le NO pour inhiber l'activation plaquettaire par blocage du changement conformationnel dépendant du calcium du récepteur au fibrinogène : la GPIIb/IIIa, nécessaire à la fixation du fibrinogène sur son récepteur.

2.3.2. Contrôle de la coagulation

Plusieurs systèmes régulent la coagulation.

L'antithrombine (AT) se lie à la thrombine pour l'inactiver. Cette inactivation est accélérée lorsque l'AT se lie aux héparanes sulfates et aux protéoglycanes de la surface endothéliale.

Par ailleurs, sous l'action de l'héparine, les CE libèrent du TFPI (tissue factor pathway inhibitor), qui se lie au facteur Xa au sein du complexe FT/FVII/Xa et diminue ainsi la génération de thrombine (14). Un des autres systèmes inhibiteurs de la coagulation est le système Protéine C (PC)/Protéine S (PS). L'endothélium exprime à sa surface la thrombomoduline (TM) (15). La thrombine se lie à la TM pour activer la protéine C en PCa (16). La PCa interagit avec son cofacteur, la PS, pour exercer son activité anti-coagulante en inactivant les accélérateurs de la coagulation que sont les facteurs Va et VIIIa. Un récepteur, présent à la surface des CE, participe à la fixation de la PC qui augmente sa vitesse d'activation par la thrombine ; ce récepteur est l'endothelial protein C receptor (EPCR) (17).

Enfin, la TM diminue également l'activation des plaquettes, des facteurs V, XIII et du fibrinogène par la thrombine. La TM inhibe l'activité du facteur Xa et donc la génération de thrombine (18).

2.3.3. Contrôle de la fibrinolyse

Les CE peuvent selon les situations développer une activité pro- ou anti-fibrinolytique (19). L'endothélium est profibrinolytique au repos par sécrétion de l'activateur tissulaire du plasminogène, (t-PA). Le t-PA est un puissant activateur de fibrinolyse, permettant la transformation de plasminogène en plasmine qui dégrade la fibrine (20). Les CE portent le site de liaison du t-PA. Cette adhésion va favoriser le développement de son activité fibrinolytique, ce qui stimule la prolifération cellulaire.

En conditions d'activation par divers stimuli, tels que la thrombine, les endotoxines, les cytokines inflammatoires (21) et les LDL (low-density lipoprotein) oxydées entre autres (22), les CE sécrètent le principal inhibiteur du t-PA, le plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). Ce dernier, dans le sang circulant, se complexe au t-PA et à l'urokinase (u-PA), et neutralise l'activité fibrinolytique (23).

Par ailleurs, la liaison de la thrombine à la TM de la surface endothéliale accélère sa capacité d'activation du TAFI (thrombin activable fibrinolysis inhibitor) qui clive des extrémités lysines du réseau de fibrine, empêchant l'activation du plasminogène en plasmine et retardant la fibrinolyse (24). Le TAFI joue également un rôle dans les processus inflammatoires par l'élimination des résidus d'arginine ou de lysine C-terminal de la bradykinine, de l'ostéopontine clivée par la thrombine, du C3a et du C5a.

2.4. Contrôle de l'inflammation

Dans le cas d'une inflammation systémique, l'activation des CE déclenche une puissante réponse immunitaire innée pour éliminer l'agent pathogène. Dans certaines conditions spécifiques, les CE

peuvent également contribuer à l'activation de l'immunité adaptative et au recrutement de lymphocytes spécifiques à l'antigène (25).

L'interaction des cellules avec les vaisseaux se fait en quatre étapes (Figure 6) : attachement des cellules par une liaison réversible, permettant le roulement des cellules à la surface de l'endothélium, puis activation des cellules adhérentes avec une adhésion qui devient irréversible et résistante au flux, et enfin diapédèse des leucocytes entre les CE pour exercer leurs fonctions dans le tissu sous-jacent (26). Contrairement aux plaquettes qui se lient au niveau du sous-endothélium des artères soumises à de fortes forces de cisaillement, les leucocytes s'attachent aux CE lorsque les forces de cisaillement sont faibles. La phase d'attachement des leucocytes est principalement médiée par la P-sélectine sur l'endothélium qui se lie au ligand glycoprotéique 1 de la P-sélectine (PSGL-1) (27). L'expression de la P-sélectine et de la E-sélectine est induite par les CE activées. Ces molécules peuvent ainsi initier les réponses immunitaires par adhésion des leucocytes, et les réponses hémostatiques par liaison aux plaquettes activées, potentialisant les interaction plaquettes/neutrophiles (28). Les InterCellular Adhesion Molecule (ICAM) 1 et 2, et Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM-1) vont se fixer au CD11 exprimés sur la surface endothéliale, aboutissant à une adhésion de haute affinité (29). Les CE synthétisent des chimiokines et expriment des molécules comme PECAM-1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule) permettant la transmigration de leucocytes. Une matrice provisoire va alors se former dans les tissus, permettant l'extravasation des leucocytes. La production concomitante de vasodilatateurs augmente l'acheminement des leucocytes dans les tissus.

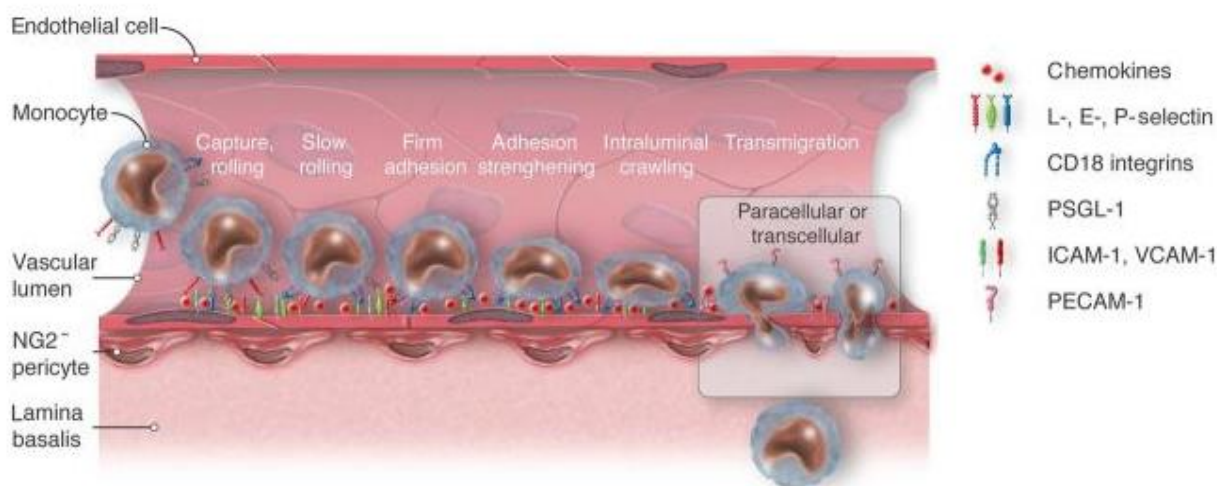


Figure 6. Vue schématique de la cascade d'adhésion des monocytes. ICAM-1, molécule d'adhésion intercellulaire-1 ; VCAM-1, molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1 ; PECAM-1, molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires ; PSGL-1, ligand glycoprotéine P-sélectine-1. (26).

2.5. Contrôle de la perméabilité vasculaire

L'endothélium régule le passage des molécules et la circulation des cellules du sang aux tissus. Cette régulation passe par des jonctions inter-endothéliales contrôlant la perméabilité cellulaire avec une régulation de l'ouverture et de la fermeture. Elles participent aussi à la croissance cellulaire et la synthèse protéique par transmission de signaux intracellulaires. Trois types principaux de jonctions endothéliales sont décrits :

- Les jonctions serrées ou tight junctions interviennent dans le contrôle des échanges entre le sang et les tissus. Ce rôle doit être finement régulé dans le cerveau ou les artères de gros calibre (30).
- Les jonctions adhérentes sont un complexe très dynamique. Leur présence est ubiquitaire le long de l'arbre vasculaire, et essentielle à l'organisation initiale de la monocouche de l'endothélium. Elles ont un rôle majeur dans l'adhérence, la communication cellulaire et la perméabilité ; elles limitent la migration des cellules et participent à l'inhibition de contact de la croissance cellulaire (31).
- Les jonctions communicantes ou gap junctions forment un endothélium dit discontinu. Elles sont essentielles pour les échanges intercellulaires.

3. Les progéniteurs endothéliaux circulants

3.1. Origine des progéniteurs endothéliaux circulants

Les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) sont des cellules immatures produites dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche nommée l'hémangioblaste. L'hémangioblaste peut, en fonction du contexte de stimulation, s'orienter vers la lignée de CE ou de cellules hématopoïétiques. En condition physiologique, une faible fraction, entrent dans la circulation générale pour permettre la régénération de l'endothélium vasculaire(32).

En 1997, Asahara et al ont été les premiers à identifier ces cellules d'origine médullaire, qui ont la capacité de se différencier en CE matures (33). Dans la majorité des cas, les cellules adhérentes se différencient en CE. Ces dernières sont décrites comme présentant des marqueurs phénotypiques typiques, à savoir CD34, VEGFR2, Tie2, CD31, vWF, la E-sélectine, la lectine UEA-1 et la NOS.

3.2. Mobilisation des progéniteurs endothéliaux

La mobilisation des PEC peut être définie comme le passage des progéniteurs endothéliaux médullaires vers la circulation sanguine. Cette mobilisation est régulée par les cellules stromales médullaires, le microenvironnement et diverses cytokines sécrétées.

Dans des modèles d'ischémie, l'hypoxie tissulaire induit une mobilisation des progéniteurs endothéliaux en augmentant l'expression du facteur de transcription hypoxia inducible factor 1 α , qui est un facteur pro angiogénique. Hypoxia inducible factor 1 α (34) favorise la sécrétion du VEGF ainsi que du stromal derived factor 1 qui sont des chimiokines pro angiogéniques (35). L'administration de VEGF dans un modèle murin a entraîné une augmentation des PEC (36). La stimulation de eNOS est elle-même médiée par l'activation de la phosphatidylinositol 3 kinase (Pi3K) (37).

A l'inverse, il existe certains facteurs qui diminuent la circulation des PEC. La première étant l'âge avancé (38). Le tabagisme chronique entraîne aussi une diminution du nombre des PEC et de leurs fonctions en augmentant l'activité des télomérases qui favorise la sénescence cellulaire (39). Pour finir, l'hypercholestérolémie diminue l'angiogénèse. L'oxydation du LDL cholestérol (ox LDL) entraîne une déphosphorylation de la Pi3K par l'intermédiaire de l'AKT kinase. Cette déphosphorylation aboutit à une perte des effets cytoprotecteurs de la Pi3K mais aussi à une stimulation de mitogen-activated protein kinase (MAPK) qui est un facteur pro apoptotique (40).

Cette mobilisation des PEC peut être induite par des agents pharmacologiques. Les statines, antagonistes compétitifs de l'HMG CoA réductase, augmentent le nombre de PEC et favorisent la différenciation des PECs en stimulant la voie Pi3K/AKT (41). De même, l'administration de G-CSF ou d'EPO, utilisé en thérapeutique pour mobiliser les cellules souches hématopoïétiques, mobilise également les progéniteurs endothéliaux. L'administration de VEGF mais aussi de L-arginine, substrat de eNOS, favorisent l'angiogénèse (42,43).

Il existe 2 types différents de PEC (Tableau 1) : les « myeloid angiogenic cells » (MAC) et les « endothelial colony forming cells » (ECFC) (44). Leurs rôles dans l'angiogénèse diffèrent aussi : les MACs ne se différencient pas en cellules endothéliales mais favorisent l'angiogénèse par une sécrétion paracrine de facteurs pro angiogéniques. Les ECFC semblent être les cellules qui aboutissent *in fine* aux CE et participent ainsi à la vasculogénèse, l'angiogénèse et au maintien de l'intégrité vasculaire (45). L'association de ces deux contingents cellulaires est complémentaire.

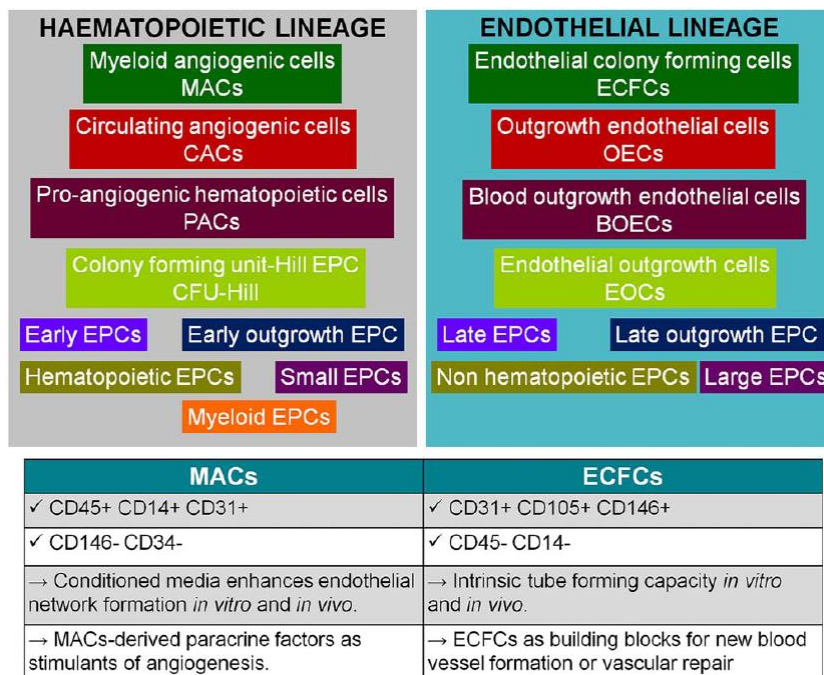


Tableau 1. Distinction entre les MACs et les ECFCs (d'après Medina RJ, Stem cells Transl Med, 2017 (44))

4. Le glycocalyx

Le glycocalyx (GCX) est une structure dynamique, localisée au niveau de la couche la plus luminale du vaisseau sanguin. Il est principalement composé d'une variété de protéoglycanes et de GP. Le GCX reste accroché aux CE par l'intermédiaire des glycosaminoglycanes (GAG). Le GCX a une épaisseur variant de 0,2 mm à 2 mm en fonction du type de vaisseau et de sa localisation anatomique dans l'organisme (46,47). Les protéoglycanes ont un squelette protéique qui est connecté aux chaînes de GAG chargés négativement. Les protéines sont étroitement liées par un ancrage aux glypicans et syndécans.

La famille des syndécans est particulièrement représentée avec 4 sous-classes différentes dont la particularité réside dans leur ancrage transmembranaire avec une partie intra-cytoplasmique capable de transmettre un signal. Les GAG sont des polymères linéaires de disaccharides qui possèdent des zones hypo ou au contraire hyper sulfatées qui constituent des domaines de liaison à des protéines circulantes. A ce jour, 5 GAG sont caractérisés, parmi lesquels l'héparane sulfate, la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate et l'acide hyaluronique, régulant la coagulation (48):

- L'héparane sulfate potentialise l'activité de l'AT.
- La chondroïtine sulfate intervient pour faciliter l'interaction thrombine/thrombomoduline, et activer la protéine C.
- Le dermatane sulfate potentialise l'activité le second cofacteur de l'héparine

- L'acide hyaluronique est un long polymère, intégré dans le GCX par connexion au récepteur CD44 sur la membrane des CE (49).

Le GCX supporte et contient des molécules d'adhésion (ICAM/VCAM), le vWF, l'AT, l'inhibiteur de la voie du FT, la NO-synthase (NOS), et la superoxyde dismutase extracellulaire (50). L'altération du GCX a pour conséquence, l'activation ou la libération des molécules sus mentionnées. Cette altération peut être causée par différentes situations pathologiques comme l'inflammation, l'ischémie ou le traumatisme (48). Le détachement du GCX de la cellule endothéliale provoque une dysfonction endothéliale qui altère la fonction de barrière vasculaire. La coagulation plasmatique s'active alors de façon excessive (51), tout comme l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. L'adhésion et la migration des leucocytes sont également favorisées (52).

II- Dysfonction endothéliale et hypercoagulabilité

La perturbation du flux vasculaire peut provoquer un état inflammatoire au sein des CE et induire un stress du réticulum endothélial (53). Ce stress peut exacerber l'état inflammatoire au sein des CE par l'augmentation des niveaux d'activation de NF- κ B (54). Un flux sanguin perturbé peut également induire la sénescence des CE par l'activation des voies p53/p21. Ceci induit un phénotype de sécrétion caractérisé par de faibles niveaux de NO, une activité accrue des facteurs de transcription de la protéine de liaison de l'élément de réponse à l'AMP cyclique et des niveaux élevés de p38 MAPK et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (55). L'activation de l'endothélium favorise également le recrutement des monocytes circulants via la régulation à la hausse des chimiokines, plus particulièrement CCL5, CXCL1, les cytokines MCP-1 et IL-8 et les protéines d'adhésion de surface VCAM-1, ICAM-1 et P-selectine et plusieurs glycosaminoglycanes (56–58). Sous l'effet de ces chimiokines inflammatoires, les CE deviennent procoagulantes. Une diminution de synthèse de TM par la CE entraîne une diminution de l'activation de la protéine C et une augmentation de la production de PAI-1. De façon synergique, les CE commencent à exprimer le FT et le FV procoagulant en réponse aux médiateurs inflammatoires (le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α et l'interleukine-1 (IL1)) (59). Les monocytes circulants recrutés vont produire des microvésicules favorisant l'activation de la coagulation. Ces microvésicules sont principalement composées de FT et de phosphatidylsérine. Le FT initie la voie extrinsèque de la de coagulation, agissant comme son activateur principal, tandis que la phosphatidylsérine sert de support à la coagulation en recrutant les facteurs vitamine K dépendant : facteurs VII, IX, X et prothrombine (60).

L'ensemble de ces altérations augmente ensuite le dépôt local de fibrine sur la paroi du vaisseau. Les modifications de la perméabilité de la paroi du vaisseau favorisent en outre le passage des cellules inflammatoires et des protéines de coagulation dans la paroi du vaisseau, stimulant ainsi la production

locale de thrombine, enzyme prothrombotique, mais aussi pro-inflammatoire. L'accumulation rapide de fibrine dans la formation de son réseau augmente sa résistance à la fibrinolyse tout en renforçant la densité du réseau (61). Les microvésicules monocytaires fusionnent avec les plaquettes, transférant le FT pour initier la coagulation sanguine (62). Ce transfert est médié par l'interaction entre le PSGL-1 sur les microvésicules et la PS sur les plaquettes (63).

En plus des mécanismes de dysfonction endothéliale liés à l'inflammation, le FVIIa, le FXa, et la thrombine peuvent agir directement sur les cellules de la paroi des vaisseaux, par l'intermédiaire des récepteurs PAR (64). Les PAR appartiennent à une famille de quatre récepteurs couplés aux protéines G, connus avec un mode unique d'activation. L'activation de PAR par la thrombine dépend du clivage protéolytique du domaine N-terminal du récepteur, générant une nouvelle extrémité aminée qui agit comme un ligand pour activer le récepteur. La thrombine clive avec 4 fois plus d'efficacité le récepteur PAR-1 que la PCa (65). Cette différence observée a un impact physiologique sur la paroi des vaisseaux. La PCa peut activer le PAR-1 sur les CE de manière dépendante de l'EPCR ce qui induit un effet thérapeutique de la PCa dans le sepsis (66). Il a également été démontré que l'activation de PAR1 avait un effet protecteur en empêchant l'apoptose des CE et des neurones dans un modèle murin d'accident ischémique cérébral (67). Contrairement à la PCa, il a été démontré que le clivage par la thrombine de PAR-1 induisait des réponses pro-inflammatoires, une apoptose et augmentait la perméabilité de la barrière dans les CE (68). L'action de la thrombine sur le récepteur plaquettaire induit leur activation et leur agrégation, amplifiée par la sécrétion de vWF secondaire à l'atteinte endothéliale (69).

Ainsi en fonction de l'étiologie responsable de la dysfonction endothéliale les mécanismes d'hypercoagulabilité seront différents. Dans ce travail de thèse, nous allons décrire trois situations cliniques responsables de dysfonction endothéliale : le syndrome des antiphospholipides, la fibrose pulmonaire idiopathique et l'infection à SARS-Cov2.

1. Syndrome des antiphospholipides

1.1. Généralités

Les premiers anticorps antiphospholipides (aPL) ont été découverts en 1906 chez un patient syphilitique. Cette sérologie, qui ciblait la cardiolipine, est devenue une méthode de diagnostic connue sous le nom de Venereal Disease Research Laboratory (70). L'évolution des techniques de laboratoire a permis en 1983, grâce à *Hughes et al* (71), de mettre en évidence, avec plus de sensibilité, la présence des anticorps anticardiolipine (aCL) chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique (LES) ayant des antécédents de thrombose. Au début des années 1990, un autre anticorps, l'anticorps anti-béta-2-glycoprotéine 1 (anti-β2GPI), a été mis en évidence dans

les phénomènes de thrombose associés ou non aux aCL (28). Ces 2 auto anticorps font partie des critères diagnostiques du SAPL avec le lupus anticoagulant (LA) (72).

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) est un syndrome clinico-biologique associant la persistance d'aPL et une atteinte vasculaire de type thrombose veineuse et/ou artérielle, et /ou une morbidité obstétricale (Tableau 2).

La prévalence est estimée à 0,5% (73) et les aPL peuvent être retrouvés de façon transitoire chez 5% de la population générale sans être associés à des complications cliniques.

<p>1 critère clinique objectif</p> <p><u>Soit vasculaire</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Thrombose artérielle ▪ Thrombose veineuse ▪ Thrombose petits vaisseaux <p><u>Soit obstétrical</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 3 FCS (< 10 sem) ▪ 1 mort fœtale (> 10 sem) ▪ Prématurité associée à <ul style="list-style-type: none"> ▪ Éclampsie ▪ Pré-éclampsie ▪ Insuffisance placentaire 	<p>+</p>	<p>1 critère biologique (contrôlé à 12 sem)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Anticardiolipine (taux moyen ou élevé IgG ou IgM) ▪ Anti-β2GPI (> 95^{ème} percentile) IgG ou IgM ▪ Anticoagulant circulant « lupique » (dRVVT, TCA)
--	-----------------	--

Tableau 2. Critères de classification de Sydney (d'après O. Meyer)

1.1.1. Syndrome des antiphospholipides thrombotique

Les principales données épidémiologiques proviennent du projet « *Europhospholipid* », qui a consisté en la création d'un registre international prospectif incluant 1000 patients suivis au cours du temps (74). L'analyse initiale à l'inclusion des patients faisait état d'une prépondérance féminine du SAPL surtout dans sa forme associée au LES (8 femmes/1 homme) comparativement à la forme primaire (3.5F/1H). La moyenne d'âge de survenue du SAPL était de 42±14 ans. Près de 53 % des patients avaient une forme primaire, le lupus érythémateux systémique était quant à lui associé au SAPL dans 36 % des cas. La mortalité à 10 ans était de 9.7 % avec comme principales étiologies, la récurrence thrombotique (36.5 %), les infections (23%) et les hémorragies (10%), secondaires aux traitements

anticoagulants. Au cours du suivi à 5 ans et à 10 ans, les taux de récurrences thrombotiques étaient respectivement de 16.6 % et de 15.3 % (75,76).

L'un des enjeux majeurs de cette pathologie est de définir des profils de risque de récurrence afin d'ajuster le traitement antithrombotique et même de discuter un arrêt de celui-ci chez les patients à très faible risque. Les données cliniques actuelles permettent quant à elles d'établir que les patients avec atteintes artérielles et/ou microcirculatoires ont un profil de risque de récurrence plus important.

1.1.2. *Syndrome des antiphospholipides obstétricaux*

Le SAPL purement obstétricaux est caractérisé cliniquement par une morbidité de la grossesse chez les femmes sans antécédent de thrombose (avortements répétés et inexplicables avant la 10^e semaine, perte fœtale inexplicée à partir de la 10^e semaine, ou naissance prématurée avant la 34^e semaine en raison d'une prééclampsie) (77). Dans le registre Europhospholipid, les formes obstétricales à l'inclusion étaient essentiellement représentées par les fausses couches précoces (10 semaines d'aménorrhée) dans 17% des cas. Au cours du suivi, 188 grossesses sont survenues avec un taux de naissances vivantes de 73%. La principale complication obstétricale était la survenue d'une fausse couche précoce chez 16.5% des grossesses, alors qu'une prématurité ou un retard de croissance intra-utérin étaient rapportés dans 48.2 % et 26 % des grossesses. Dans un registre uniquement constitué de 1000 patientes atteintes d'un SAPL obstétricaux (EUROAPS) (78), il y avait une complication du SAPL dans 65,1% des cas : fausses couches précoces dans 38,6% des cas, prématurité dans 22,8% des cas, pré éclampsie dans 22,7% des cas et retard de croissance intra utérin dans 20,7%. Néanmoins dans 74,7% des cas, une naissance vivante a été observée.

1.1.3. *Porteurs asymptomatiques d'anticorps antiphospholipides*

Les porteurs asymptomatiques d'aPL ont une persistance d'aPL sans événement clinique. Diverses situations peuvent induire transitoirement des aPL, telles que les infections virales et bactériennes, certains traitements médicamenteux (bêta-bloquants, neuroleptiques...). Ces situations sont rarement associées à un événement clinique.

Des études, menées chez des porteurs asymptomatiques d'aPL, ont démontré que le risque de survenue d'un événement thrombotique était lié au profil des aPL (la présence d'un lupus anticoagulant serait associé à un risque thrombotique plus important) (79–81). Le nombre d'anticorps positifs est aussi associé à un sur risque thrombotique : Pengo *et al.* ont montré que le risque annuel de premier événement thrombotique était de 0.4% en cas de simple positivité contre 1.36% en présence de deux tests positifs et de 5.3% en cas de triple positivité (82). De plus, l'association de ces aPL à des traitements ou comorbidités (contraception oestroprogestative, tabagisme, hypertension) favorise la survenue d'événement thrombotique (80,81,83).

1.2. Physiopathologie du syndrome des antiphospholipides

1.2.1. Anticorps antiphospholipides

La bêta-2-glycoprotéine 1 est constituée de 5 domaines reliés par des ponts disulfures. Elle circule sous forme d'un "beignet" replié (Figure 7). Sous cette forme, aucun anticorps ne peut se fixer à la GP. Il a été démontré que l'apparition des anticorps anti- β 2GPI pouvait être induite par injection à des souris du domaine 1 de la bêta-2-glycoprotéine I, induisant les stigmates d'un SAPL (84). Les agents infectieux semblent être le principal trigger de la formation des aPL, en induisant un changement conformationnel. La liaison à la protéine H du *Streptococcus pyogenes* expose ainsi un épitope cryptique du domaine 1 pour les auto-anticorps (85). Ces aPL sont cependant transitoires, et d'autres stimulations semblent nécessaires pour développer un SAPL.

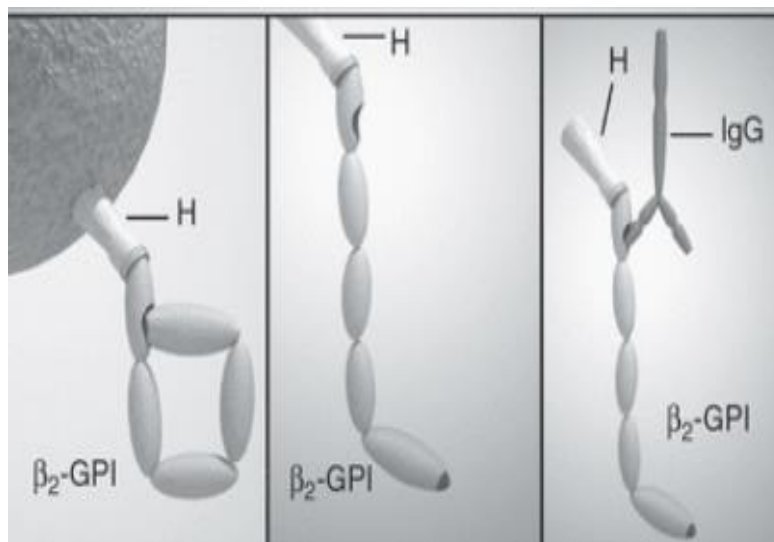


Figure 7. Conformation de la bêta-2-glycoprotéine 1 (85)

1.2.1.1. Le lupus anticoagulant

Les aPL ayant une activité Lupus anticoagulant (LA) allongent *in vitro* les tests de coagulation dépendant des PL. Les aPL allongent le temps de céphaline+activateur, par liaison aux PL qui permettent normalement la stabilisation des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants. Il en résulte une liaison aux PL permettant la stabilisation et l'activation des différents facteurs de la coagulation qui entraîne une formation de fibrine ralentie. La détection de l'anticoagulant lupique se fait en plusieurs étapes : le dépistage, la démonstration d'un effet inhibiteur et la confirmation. Elle nécessite la réalisation de deux tests de coagulation (lors de l'étape de dépistage) basés sur des principes différents. La sensibilité et la spécificité de la recherche de l'anticoagulant lupique en général

varient respectivement de 82 % à 99 % et de 88 % à 99 %. Les techniques doivent suivre les recommandations de l'International Society of Thrombosis and Hemostasis (86).

Le risque de thrombose veineuse avec persistance d'un LA est de 6.14 [2.74-13.8] et le risque de thrombose artérielle est de 3.58 [1.29-9.92] (87). En outre, parmi les anti- β 2GPI, ceux qui reconnaissent le domaine 1 de la β 2GPI sont détectés par les trois tests biologiques (LA, aCL et anti- β 2GPI) et seraient les plus pathogènes. Il n'est donc pas étonnant qu'une triple positivité de ces tests biologiques soit associée à un très fort risque relatif (RR) de thromboses (RR :33,3) (82,88) .

1.2.1.2. Les anticorps anticardioline

La cardiolipine est un phospholipide membranaire présent dans la paroi des mitochondries. Les tests immunologiques comme la chimioluminescence ou les billes multiplex sont les plus utilisés en pratique courante. L'ajout de β 2GPI a permis d'augmenter la sensibilité du test et permet de détecter trois types d'anticorps différents :

- Les anticorps reconnaissant le domaine 1 de la β 2GPI, qui sont les plus associés aux thromboses
- Les anticorps reconnaissant les autres domaines de la β 2GPI, sans pertinence clinique particulière
- Les anticorps reconnaissant la cardiolipine de manière indépendante de la β 2GPI. Ce sont les anticorps qui sont le plus souvent produits suite aux infections virales. Ils sont le plus souvent transitoires, mais peuvent persister en cas d'infection chronique (VIH, Lèpre)

1.2.1.3. Les anticorps anti- β -2-glycoprotéine I

La β 2GPI (apolipoprotéine H) est la cible principale des anticorps de SAPL et elle constitue le cofacteur indispensable de la liaison des aCL aux phospholipides membranaires. La β 2GPI est composée d'une chaîne polypeptidique organisée en 5 domaines. Son domaine 5 lui confère une forte affinité pour les molécules chargées négativement comme les phospholipides membranaires. Les travaux en microscopie électronique ont confirmé la présence de deux états conformationnels différents : un globulaire qui correspond à la forme circulante de la protéine et un autre ouvert lorsque la protéine est liée aux phospholipides. C'est le passage de la forme « fermée » à la forme « ouverte » qui démasque un épitope cryptique (Arg39-Arg43) du domaine 1 contre lesquels sont dirigés les aPL les plus pathogènes (84).

1.2.2. SAPL et hémostasie

1.2.2.1. Le facteur tissulaire

Il a été démontré que le FT était surexprimé au cours du SAPL. Les concentrations circulantes de FT proviennent des CE et des monocytes (89). La concentration plasmatique circulante de FT est

retrouvée augmentée chez les SAPL ayant développé un évènement thromboembolique (90). Cette expression est associée à des formes plus grave de SAPL (91,92). L'induction du FT est dépendante de l'activation de la NADPH endosomale et peut être limitée par des inhibiteurs de NFκB indiquant un rôle critique de ce facteur nucléaire dans la signalisation (93). Cette expression est dépendante de la voie de la protéine kinase activée par le mitogène p38, et de la voie MEK-1/ERK (92). Le TNFα représente l'étape intermédiaire dans l'expression du FT induite par l'anti-β2GPI (94). Le TFPI participe aussi à l'amplification du phénotype procoagulant dans le SAPL. Le TFPI oriente les monocytes vers une stimulation pro-inflammatoire, initiant les phénomènes thrombotique (95).

1.2.2.2. Inhibition de la protéine C activée

Le contrôle de la cascade de coagulation passe principalement par l'AT, inhibant tous les facteurs de la coagulation. La PCa intervient en inhibant les deux cofacteurs amplifiant la coagulation : les facteurs Va et VIIIa. L'hypothèse d'une RPCa dans le SAPL a été confirmée (96) notamment à l'aide des tests de génération de thrombine où il a été démontré une insensibilité à la protéine C exogène. Les anticorps ciblant le complexe antiphosphatidylsérine-antiprothrombine ont d'ailleurs une inhibition majorée de la PCa (97).

1.2.2.3. Inhibition de l'activité de l'annexine A5

Les aPL agissent par ailleurs sur le "bouclier" d'annexine A5 à la surface des cellules. L'annexine A5 est une protéine de liaison phospholipidique dépendante du calcium, exprimée par divers types de cellules, y compris les CE et les trophoblastes placentaires (98). Physiologiquement, ce bouclier inhibe par un jeu de charge électro-négative l'activation de la coagulation par l'intermédiaire de phospholipides anioniques : il limite en partie leur fixation à la surface cellulaire empêchant ainsi le déclenchement de la coagulation plasmatique. La réduction de l'annexine A5 sur les membranes cellulaires résulte d'un déplacement concurrentiel des IgG anti-β2GPI et les complexes immuns formés, empêchent le bouclier d'annexine A5 de se mettre en place et d'exercer son effet anticoagulant (99).

1.2.2.4. Inhibition du tissue factor pathway inhibitor

L'autre système de coagulation fortement impliqué au cours du SAPL est celui du TFPI. De nombreuses données cliniques ont démontré une diminution de TFPI circulant, associée à la persistance d'un LA et d'un évènement thrombo-embolique (100,101). Des anticorps anti-TFPI ont été mis en évidence chez certains patients SAPL, associés à un relargage plus important de FT par les monocytes (102). De plus, chez certains patients SAPL, le profil de génération de thrombine montre une résistance à l'action du TFPI (103).

1.2.2.5. Inhibition de la fibrinolyse

Plusieurs études se sont intéressées à l'inhibition de la fibrinolyse dans le SAPL. Ames *et al.*, ont démontré une augmentation du PAI-1 et une diminution du tPA chez les patients SAPL ayant eu un événement thrombotique (104).

Un autre mécanisme potentiel de fibrinolyse altérée chez les patients atteints de SAPL est suggéré par des niveaux élevés de lipoprotéine a (Lpa) dans le plasma des SAPL (105). La Lpa partage une homologie structurale avec le plasminogène, et peut interférer dans la dégradation de la fibrine, entraînant un défaut de fixation de la plasmine, et une augmentation d'expression de PAI-1 par les CE (106). Il a aussi été démontré la persistance d'anticorps anti-plasmine chez les patients SAPL (107). La β 2GPI peut également réguler la fibrinolyse par des interactions directes avec le plasminogène. Le domaine 5 de β 2GPI peut être clivé de manière protéolytique par la plasmine pour créer un β 2GPI "entaillé", qui a une affinité plus faible pour les phospholipides anioniques que le β 2GPI intact (108). De plus, des niveaux accrus de TAFI et de TAFIa chez les patients atteints de SAPL ont été rapportés et sont corrélés à une hyperexpression du C5a (109). Cette augmentation est associée à une altération de la lyse du caillot de fibrine, majorée chez les SAPL triple positifs (110).

1.2.3. Diminution de la production de NO

Les patients atteints de SAPL ont une réduction des taux plasmatiques de nitrites, et une altération de la dilatation médiée par le flux suggérant une diminution de la production basale du NO par la eNOS (111). L'interaction des aPL avec β 2GPI engage les récepteurs transmembranaires, le récepteur 2 de l'apolipoprotéine E (apoER2 ; LRP8). La délétion globale de l'apoER2 chez la souris permet de protéger contre la thrombose induite par les aPL (112). L'apoER2 endothélial intervient dans le recrutement de Disabled-2 et de la protéine transformante 1 contenant le domaine Src, induit par les aPL. Ce complexe active la phospholipase A2 qui va induire la déphosphorylation d'AKT et de la eNOS, et en conséquence une diminution de la production de NO et la formation d'un thrombus (113).

1.2.4. Hyperactivation du complément

Le complément a un rôle critique dans la morbidité obstétricale ou les thromboses induites par les aPL dans les modèles murins de SAPL. Le transfert passif d'IgG de patients atteints de SAPL entraîne une perte fœtale chez les souris enceintes (114). Les souris déficientes en C3 sont naturellement résistantes à la perte fœtale induite par les aPL (115). Il a aussi été démontré que la déficience en C5 ou le traitement des souris avec un anticorps monoclonal anti-C5a protège contre la perte fœtale et le retard de croissance induits par les aPL (116). L'activation du complément a été observée dans les sérums de patients avec antécédents de syndrome catastrophique des antiphospholipides et de thromboses. L'activation du complément était observée au moment d'un événement thrombotique et 68,5 % des patients avaient toujours une hyperactivation du complément 1 an après l'événement

thrombotique (117). L'hyperactivation du complément est retrouvée dans la théorie du "two hit trigger", à savoir une atteinte endothéliale associée à une hypercoagulabilité secondaire à une autoimmunité (118). Un déséquilibre entre l'activation du complément et sa régulation à la surface de la paroi vasculaire est à l'origine d'orage thrombotique, qui se traduisent par des événements thrombotiques graves, largement résistants aux traitements anticoagulants et/ou antiplaquettaires. Une piste thérapeutique potentielle est l'inhibition de la voie terminale commune du complément par l'éculizumab. Une réponse a été observée dans une série de patients atteints d'un le syndrome catastrophique des antiphospholipides réfractaire (119). Cinq des patients ont survécu. Cette étude préliminaire a cependant un biais qui est une initiation tardive du traitement (après anticoagulation curative, glucocorticoïdes, échange plasmatique et/ immunoglobuline polyvalente). Un traitement précoce pourrait potentiellement améliorer la survie des patients.

On comprend ainsi que la physiopathologie du SAPL est complexe ; elle est résumée dans la figure 8

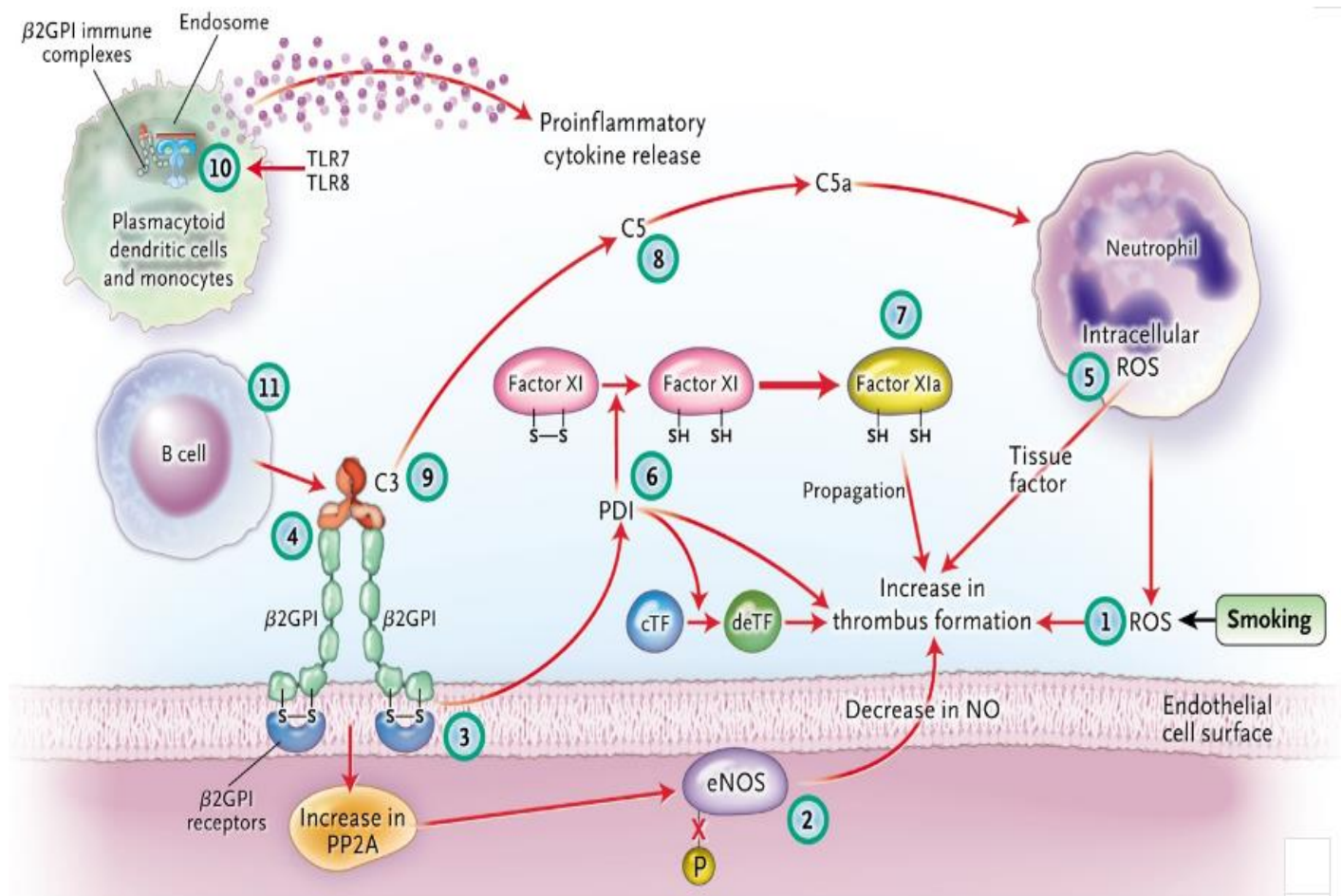


Figure 8. Physiopathologie du SAPL

1.3. Traitement du SAPL

1.3.1. Thrombose artérielle et veineuse

1.3.1.1. Prévention primaire

Il est recommandé de différencier les patients en prévention primaire ou secondaire. La prévention primaire reste controversée. Une étude multicentrique menée par Erkan *et al.* n'a pas mis en évidence de bénéfice d'un traitement par faible dose d'aspirine chez les patients asymptomatiques (120). Toutefois, chez les patients à haut risque (triple positivité), il est recommandé d'introduire une faible dose d'aspirine au long cours (121). Les recommandations actuelles sont un contrôle des facteurs de risque cardiovasculaires et une thromboprophylaxie lors des situations à risque (immobilisation, chirurgie, contraception, grossesse) (122).

1.3.1.2. Prévention secondaire

Le traitement de choix pour une thrombose veineuse est un traitement par anti-vitamine K (AVK) avec un INR cible entre 2 et 3. Il a clairement été démontré qu'un INR plus élevé expose à un risque majoré d'hémorragie sans diminuer le risque de récurrence de thrombose (123,124). La durée de l'anticoagulation est définie au cas par cas en prenant en compte le risque cardiovasculaire et le type d'aPL. Un score de risque a été défini en fonction de ces paramètres (Tableau 3). Le score GAPSS, qui définit les patients à fort risque thrombotique quand le score est supérieur à 11 mais la sensibilité de ce score est de 71% et la spécificité de 79% chez patients atteints de LES (125). Les anticoagulants oraux directs ne sont pas recommandés pour les SAPL thrombotiques, en particulier ceux qui sont triple positifs (126). Les études réalisées sur des marqueurs biologiques comme le test de génération de thrombine (127) ou chez les patients triple positifs (128), ont démontré un état hypercoagulable et une récurrence thrombotique, principalement artérielle plus importante chez les patients sous AOD par rapport aux patients sous AVK (129). Les groupes d'experts recommandent, chez les patients atteints de SAPL, un traitement un relai ou traitement par AVK en cas de diagnostic de SAPL (130,131).

Paramètre	Coefficient
Hyperlipidémie	3
Hypertension artérielle	1
ACL IgG/IgM	5
IgG/IgM anti-β2GPI	4
Anti phosphatidylsérine/prothrombine IgG/IgM	3
ACC	4

Tableau 3. Critère score GAPSS

1.3.2. SAPL obstétrical

Le SAPL étant régulièrement associé au LES et étant une maladie auto-immune, les premiers essais de traitement reposaient sur l'administration de corticoïdes pendant la grossesse (132). Des associations prednisone et faible dose d'aspirine ont ensuite été testées avec de meilleurs résultats (76,5% de grossesse arrivant à terme dans le groupe traité vs 8,5% dans le groupe non traité) (133). Devant les propriétés anti-inflammatoires et inactivatrices du complément, qui interviennent dans la physiopathologie du SAPL obstétrical, un essai comparant l'héparine à la prednisone, les deux associés à de faible dose d'aspirine, a démontré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux molécules (75% de grossesse à terme), mais il y avait moins d'effets indésirables et de morbidité associés pour la mère et le fœtus à l'utilisation de l'héparine (134). Le traitement associant héparine/héparine de bas poids moléculaire et aspirine faible dose est devenu le traitement de référence du SAPL obstétrical. Malgré le traitement par héparine et aspirine, il reste 25% de SAPL obstétricaux réfractaires.

1.3.3. Hydroxychloroquine

L'hydroxychloroquine (HCQ) est initialement un antipaludéen de synthèse. Historiquement, elle a été utilisée comme immunomodulateur dans le lupus cutané depuis 1956 (135). Depuis, l'HCQ est devenue un traitement de référence du lupus érythémateux systémique. L'intérêt qu'il suscite dans le SAPL est plus récent et fait suite au constat que l'HCQ semblait réduire le risque de thromboses veineuses chez les malades atteints de lupus associé à des aPL (136,137). Dans le SAPL obstétrical, l'association HCQ avec l'héparine et aspirine faible dose permet une diminution des pertes fœtales de 81% à 19% et permet une diminution importante de la morbi-mortalité materno-fœtale (138,139).

L'HCQ, de par ses propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires, entraîne une diminution du taux d'IL1, du récepteur soluble de l'IL8 et du récepteur soluble de l'IL2, ainsi qu'une diminution d'activation des TLR (140). En effet, cette molécule est une base faible qui s'accumule dans les lysosomes. Or l'acidification lysosomale est un pré-requis indispensable à l'activation de ces TLR. L'HCQ peut aussi avoir pour propriété de diminuer le LDL cholestérol et d'augmenter le HDL, ce qui participe à une diminution du risque athéromateux (141). L'HCQ diminue l'affinité des aPL à la β -2GPI (142) ainsi que le titre des aPL (143). Plusieurs études *in vitro* ont montré une diminution de la production de cytokines pro inflammatoires (TNF α , IL6, IFN α) ainsi qu'une diminution de l'expression d'IRAK4 et IRF7 secondaire à une inhibition de l'activation des TLR 7, 8, 9 en présence d'HCQ (144)

2. Fibrose pulmonaire idiopathique

La pneumonie interstitielle idiopathique la plus courante est la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). C'est une maladie pulmonaire interstitielle fibrosante chronique, progressive et de cause inconnue, souvent caractérisée par des images et des signes histologiques. Elle survient principalement chez le sujet âgé (145). La FPI est souvent mal diagnostiquée et le traitement par immunosuppresseur n'est pas spécifique. Elle est associée à un taux de mortalité élevé et certains traitements permettent de ralentir la progression de la maladie.

2.2. Epidémiologie

La prévalence et l'incidence de la FPI sont en augmentation. L'incidence de la FPI semble être plus élevée en Amérique du Nord et en Europe (3 à 9 cas pour 100 000 personnes-années) qu'en Amérique du Sud et en Asie de l'Est (moins de 4 cas pour 100 000 personnes-années) (146). Aux États-Unis, la prévalence de la FPI se situerait entre 10 et 60 cas pour 100 000, et semble plus diagnostiquée chez les adultes de plus de 65 ans, avec une prévalence de 494 cas pour 100 000 en 2011 (147). L'augmentation des taux d'admission à l'hôpital et de décès dus à la FPI est probablement secondaire aux comorbidités des patients (148). L'âge avancé et le sexe masculin sont des facteurs favorisant la FPI (149).

2.3. Symptomatologie et évolution clinique

Les patients atteints d'une maladie pulmonaire interstitielle ont souvent au départ un diagnostic de bronchopneumopathie chronique obstructive (150). Dans certains cas, les patients ont présenté une dyspnée et une toux sèche jusqu'à 5 ans avant que la maladie pulmonaire interstitielle ne soit diagnostiquée (150). Une reconnaissance précoce et un diagnostic précis sont susceptibles d'améliorer les résultats en évitant les thérapies potentiellement dangereuses (les glucocorticoïdes pour la FPI)(151) et en initiant rapidement des thérapies qui sont efficaces (152,153).

Le pronostic de la FPI est mauvais, avec une survie médiane de 3,8 ans chez les adultes de 65 ans ou plus (147). De nombreux patients décèdent d'une insuffisance respiratoire hypoxémique progressive et chronique (154). Chaque année, environ 10 à 20 % des patients atteints de la FPI présentent une exacerbation aiguë, caractérisée par une insuffisance respiratoire hypoxémique aggravée. Les exacerbations peuvent être déclenchées par un événement clinique (une infection, secondaire à un médicament) mais sont souvent idiopathiques (155). La plupart des patients souffrant

d'une exacerbation aiguë décèdent d'une insuffisance respiratoire aiguë. Le seul traitement en phase aiguë sont les glucocorticoïdes, avec une faible réponse, et le recours à la ventilation mécanique n'est pas recommandé (145).

2.2.1. Emphysème

Soixante-dix à 80 % des personnes atteintes de FPI ont un antécédent de tabagisme, ce qui est un facteur de risque établi (156). Environ 30 % des patients atteints de FPI présentent un emphysème pulmonaire concomitant (157), dont 8 à 27 % avec au moins 10% d'emphysème pulmonaire (158). Le syndrome de fibrose pulmonaire et d'emphysème combinés est reconnu comme un phénotype de FPI (159). Les personnes atteintes sont généralement des hommes avec des antécédents de tabagisme importants et un besoin accru en oxygène (157,159). Les caractéristiques physiologiques respiratoires reflètent l'impact opposé de la fibrose parenchymateuse et de la destruction parenchymateuse sur le débit d'air et les volumes pulmonaires, ainsi que l'impact additif sur l'échange gazeux. Une prévalence accrue de l'hypertension pulmonaire a également été démontrée chez ces patients (160). Certaines études suggèrent une réduction de la survie (157,160,161).

2.2.2. Cancer du poumon

Comparé à celui de la population générale, le risque de développer un cancer du poumon chez les personnes atteintes de FPI est presque cinq fois plus élevé, avec 3 à 22 % des patients touchés et une incidence estimée à 11 cas pour 100 000 personnes-années (162,163). Le risque annuel de cancer du poumon augmente dans les années suivant le diagnostic de FPI (162). Le lien étroit entre FPI et cancer est probablement lié aux antécédents de tabagisme (156).

2.2.3. Evènement thrombo-embolique

Des analyses longitudinales de patients atteints de FPI suggèrent que le risque de maladie thrombo-embolique veineux (MTEV) est 3 à 6 fois plus élevé chez les patients atteints de FPI que chez les sujets témoins, avec un nombre estimé de 6 à 9 nouveaux événements pour 1 000 années-personnes (164,165). L'embolie pulmonaire doit être suspectée chez les patients présentant une aggravation clinique aiguë ou subaiguë, car cela indique souvent une exacerbation aiguë (155). Les recommandations sont un traitement court, car il a été démontré que le traitement par la warfarine augmentait le risque de décès dans une population générale de patients atteints de FPI (166).

2.2.4. Maladie coronarienne

La FPI et la coronaropathie ont en commun plusieurs facteurs de risque, notamment l'âge, le sexe masculin et les antécédents de tabagisme. Parmi les plus grandes études rétrospectives, la prévalence estimée des maladies coronariennes chez les personnes atteintes d'FPI varie de 4 à 25 % (167,168). Des analyses longitudinales ont suggéré que 7 % des patients développeront une coronaropathie dans les années suivant le diagnostic d'FPI (168) et que ces patients ont un risque trois fois plus élevé de souffrir d'un syndrome coronarien aigu par rapport aux sujets témoins (164).

2.3. Physiopathologie

La survenue de FPI semble liée à des lésions épithéliales récurrentes, associé à un vieillissement épithélial accéléré, entraînant une réparation aberrante de l'alvéole lésée et le dépôt de fibrose interstitielle par les myofibroblastes. La sénescence des cellules épithéliales alvéolaires et des fibroblastes semble être un phénotype central qui favorise la fibrose pulmonaire (169). Le raccourcissement des télomères, les lésions oxydatives et le stress du réticulum endoplasmique entraînent une diminution de la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires et de la sécrétion des médiateurs profibrotiques (169,170). Les variations des gènes de la desmoplaquine, la protéine d'ancrage A-kinase 13, l'alpha catenine 1 et la dipeptide peptidase 9 confèrent une prédisposition à l'FPI (171,172). Un polymorphisme du nucléotide de la région promotrice de la mucine 5B augmente considérablement le risque de développer une FPI (173). Cette mucine est une glycoprotéine nécessaire au dégagement des voies respiratoires et aux réponses immunitaires innées contre les bactéries (174). Une clairance mucociliaire aberrante entraîne des altérations du microbiome pulmonaire et des réponses immunitaires innées qui favorisent la FPI (175). Le Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) est largement impliqué dans la FPI et est surexprimé dans la plupart des maladies fibrotiques (176). La surexpression prolongée de TGF- β supprime l'inflammation et favorise la fibrogenèse en augmentant la migration et la prolifération des fibroblastes, en activant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et en stimulant la synthèse des myofibroblastes et le dépôt de protéines de la matrice extracellulaire (177). L'hyperactivation du récepteur TGF- β déclenche une réponse fibro proliférative excessive par le biais d'un réseau complexe de cascades de signalisation, avec la voie de signalisation des SMAD2 et 3 (178). D'autres voies de signalisation vont intervenir ((PI3-AKT, RHO like GTPase, JNK P38 MAPK) (179) qui régulent la transcription des médiateurs profibrotiques (synthase d'acide gras (FASN) ; glucose transporter-1(GLUT1)), des facteurs de croissance supplémentaires (facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) ; facteur de croissance épidermique(EGF)), des micro ARN et des protéines de la matrice extracellulaire (180,180,181).

La fibrogénèse au cours de la FPI participe aussi à un remodelage vasculaire anormal. Dans les formes avancées de FPI, il a été retrouvé une plus grande mobilisation des PEC et des cellules endothéliales circulantes, reflétant une atteinte vasculaire et de l'angiogenèse (182). Les progéniteurs de patients atteints de FPI ont une senescence augmentée(183). Les cellules endothéliales ont été décrites comme contribuant à la fibrogénèse en favorisant la transition des fibroblastes aux myofibroblastes (184). En parallèle, des microvésicules d'origines endothéliales et plaquettaires sont associées à une forme plus avancée de la maladie (185). Ces microvésicules endothéliales augmente la migration des fibroblastes de patients sains, diminuant l'activité fibrinolytique endothéliale (185). Les PEC secrètent de l'IL-8, participant à l'infiltration pulmonaire par les neutrophiles dans les stades avancés de FPI (183). Les neutrophiles dérégulent la production de métalloprotéases, ayant un rôle dans la fibrogénèse (186).

L'ensemble des mécanismes physiopathologiques de la fibrose pulmonaire idiopathique est résumé dans la figure 9.

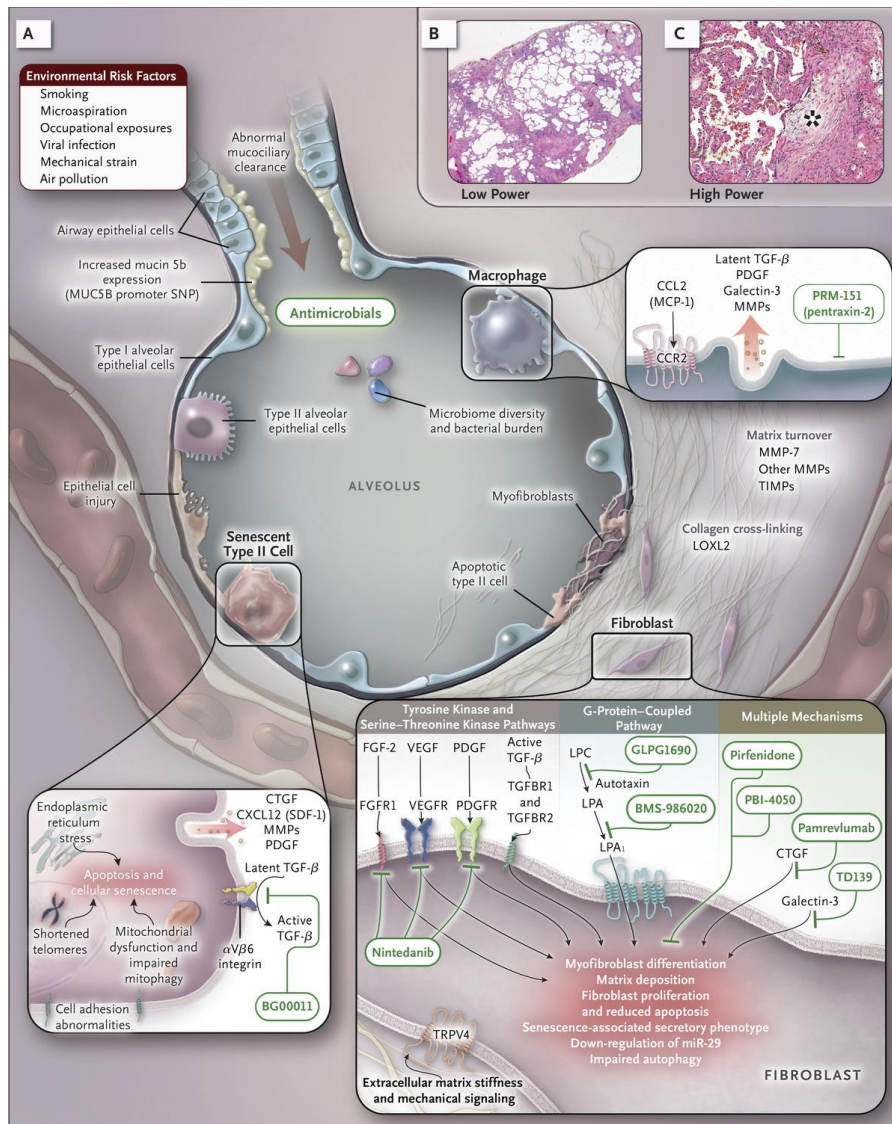


Figure 9. Physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique (187)

2.4. Hypercoagulabilité au cours de la fibrose pulmonaire idiopathique

Il a été démontré chez les patients atteints de FPI un état hypercoagulable, avec une augmentation des concentrations circulantes en FT, facteur FVII, FXa et thrombine (188,189). Tous ces facteurs de coagulation individuels exercent des effets cellulaires profibrotiques par l'activation des récepteurs de surface cellulaire activés par la protéase. En effet, le FVIIa peut contribuer au développement de la FPI en activant les PAR-2, tandis que le FXa induit des effets profibrotiques via les PAR-1 ou les PAR-2 (190,191). La thrombine, amplifie la formation de fibrine et active le PAR-1, induisant la production de collagène par la matrice extra cellulaire (192). Sur un modèle murin de FPI, les souris surexprimant la PCa endogène sont protégées de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, avec diminution de concentration en hydroxyproline et de TGF-β1. Initialement, des macrophages vont produire des

cytokines profibrotiques, activant les fibroblastes. Le recrutement des macrophages, secondaire aux lésions épithéliales, est diminué dans le poumon des souris exprimant la PCa (193).

Chez les patients atteints de FPI, des phénomènes de coagulation et de fibrinolyse se produisent dans le compartiment alvéolaire (Figure 10). La concentration en FT est élevée dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire et proportionnelle à la sévérité de la maladie chez les patients atteints d'une maladie grave et progressive (194). En parallèle de l'activation de la coagulation, le liquide de lavage bronchoalvéolaire des patients atteints de FPI exprime des niveaux accrus de PAI-1 (194). Le plasminogène naturellement présent, clive la fibrine formée (195). Une augmentation de concentration en inhibiteur du plasminogène est retrouvée chez les patients atteints de FPI. Cette augmentation est corrélée avec le dépôt de collagène un niveau pulmonaire, ce qui confirme la relation entre le PAI-1 et la présence de fibrose (196). Chez les patients en état d'exacerbation, il a été démontré une concentration plasmatique plus importante en D-dimères chez ceux qui décédaient (197). Les D-dimères reflètent à la fois l'activation de la coagulation et la fibrinolyse.

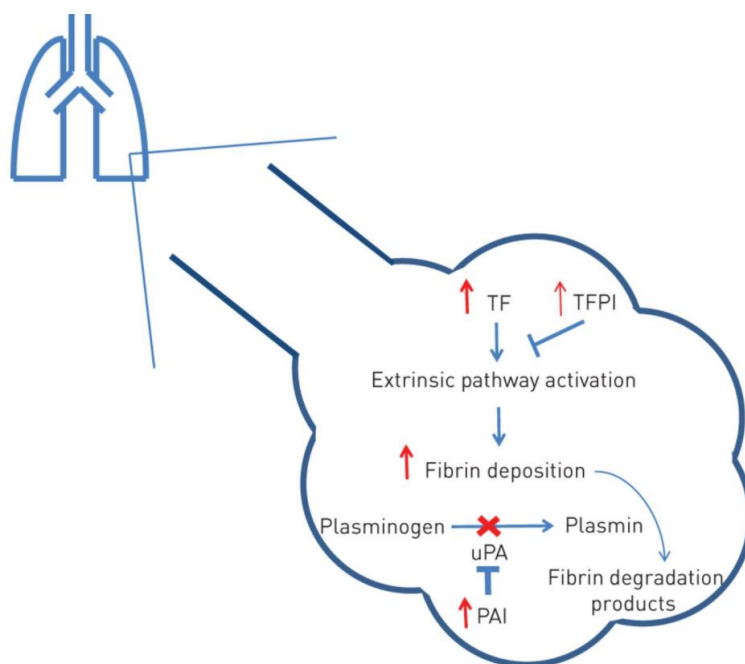


Figure 10. Compartiment alvéolaire dans la fibrose pulmonaire idiopathique (198)

2.5. Traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique

2.5.1. *Traitement non médicamenteux*

2.5.1.1. *Oxygénothérapie*

L'administration d'oxygène réduit la dyspnée à l'effort et améliore la tolérance à l'effort (199). Les recommandations sont une mise en place d'une oxygénothérapie à domicile si la saturation en oxyhémoglobine est inférieure à 88%, à l'effort ou pendant le sommeil.

2.5.1.2. Réhabilitation pulmonaire

La réadaptation pulmonaire permet chez les patients atteints d'une maladie pulmonaire avancée, d'améliorer la capacité d'exercice et la qualité de vie (200).

2.5.1.3. Transplantation pulmonaire

Seule une minorité de patients atteints de FPI reçoit une greffe. La transplantation pulmonaire peut prolonger la survie et améliorer la qualité de vie des patients. Cependant, seuls 66 % des receveurs de greffe atteints de FPI survivent plus de 3 ans après la transplantation et seuls 53 % survivent plus de 5 ans (201). Les complications les plus courantes sont le dysfonctionnement primaire du greffon, les formes aiguës et chroniques de rejet de l'allogreffe, les infections à cytomégalovirus et le cancer (201).

2.5.2. Traitement pharmacologique

2.5.2.1. Nintedanib

Le nintedanib est un inhibiteur de la tyrosine kinase qui cible les voies du facteur de croissance, y compris celles en aval des récepteurs 1, 2 et 3 du facteur de croissance endothélial vasculaire, des récepteurs 1, 2 et 3 du facteur de croissance des fibroblastes et du récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (202). En inhibant ces récepteurs à tyrosine kinase, le nintedanib interfère avec un certain nombre de processus qui ont été impliqués dans la pathogenèse de la FPI, notamment la prolifération et la migration des fibroblastes pulmonaires, et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Deux essais parallèles de phase 3, d'une durée de 52 semaines, ont montré de façon constante que le traitement par le nintedanib, comparé au placebo, était associé à un risque significativement réduit de progression de la maladie (203). Le nintedanib semble également avoir un effet bénéfique sur la mortalité (204).

2.5.2.2. Pirfenidone

La pirfenidone a un certain nombre d'effets anti-inflammatoires par la régulation à la baisse des principaux facteurs de croissance pro-fibrotiques, dont le TGF- β ; l'inhibition des cytokines inflammatoires (par exemple TNF- α), et la réduction de la peroxydation des lipides et du stress oxydatif ; mais aussi des effets anti-oxydants par la régulation à la baisse des principaux facteurs de croissance pro-fibrotiques, dont le TGF- β ; l'inhibition des cytokines inflammatoires (par exemple facteur de nécrose tumorale - α), et la réduction de la peroxydation des lipides et du stress oxydatif (205). Une méta-analyse réalisée à partir d'essais cliniques sur la FPI a montré que le traitement à la pirfenidone est associé à une réduction du risque de mortalité (206).

2.5.2.3. Treprostinil

L'effet bénéfique du treprostinil a été démontré chez des patients atteints de FPI à un stade avancé et d'hypertension artérielle pulmonaire en améliorant la fonction cardiaque droite sans compromettre l'oxygénation systémique(207). Les prostacyclines agissent par l'intermédiaire du récepteur IP, qui stimule l'adénylate cyclase, entraînant la génération d'AMP cyclique intracellulaire (AMPc) (208). Les analogues de la prostacycline inhibent la prolifération des cellules musculaires lisses par l'inhibition de Smad6 et l'activation de Smad1/5, ce qui suggère un dialogue croisé avec la signalisation TGF- β (209). Le tréprostinil inhibe les effets pro-fibrotiques du PDGF-BB et du TGF- β 1 sur les fibroblastes pulmonaires humains primaires (210).

3. Infection à SARS-CoV-2

Le Coronavirus SARS-CoV-2 provoque une maladie appelée COVID-19 (COrona-Virus Disease 2019). C'est une maladie infectieuse émergente de type zoonose virale. Les signes cliniques fréquents sont ceux d'une infection pulmonaire aiguë, allant de la forme pauci-symptomatique au syndrome de détresse respiratoire aiguë, associée à une défaillance multi-viscérale. Quatre-vingts pour cent des patients sont pauci ou asymptomatiques. Il existe cependant des complications respiratoires majeures pour le reste des patients, nécessitant une hospitalisation en réanimation et pouvant aboutir au décès dans 5 % des cas (211).

3.1. Physiopathologie

Le SARS-CoV-2 induit un stress inflammatoire produisant des cytokines, dont l'IL-6, IL-1 ou TNF- α sont susceptibles d'inactiver la protéine ADAMTS-13. Cette protéine est impliquée dans la régulation de la taille des multimères de facteur Willebrand et leur permet d'avoir une taille adaptée à une coagulation normale. Son déficit conduit à un état pro-coagulant. Ainsi la pathologie à SARS-CoV-2 pourrait induire une altération de la coagulation tout comme celle observée au cours du sepsis. De plus, dans la série de Zhang *et al.*, les patients admis en réanimation pour COVID-19 présentent un taux de D-dimères plus élevés que la normale, suggérant un état pro-thrombotique sans que la cause ne soit identifiée (212). Cette augmentation des D-dimères au cours de la maladie COVID-19 est elle-même associée à une surmortalité (213).

3.1.1. Endothélium et COVID-19

La protéine Spike des coronavirus est le médiateur de l'entrée du virus dans les cellules cibles. L'entrée dépend des interactions physiques de l'unité de surface, S1, de la protéine S avec un récepteur de la

cellule hôte, qui facilite la fixation du virus à la surface des cellules cibles. Le SRAS-CoV-2 engage l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 comme récepteur primaire (214). L'état hyperinflammatoire et pro-coagulant caractéristique de la COVID-19 implique un rôle critique de l'endothélium, à la fois comme effecteur contribuant à l'inflammation et à la thrombose, et comme organe cible, dont le dysfonctionnement peut contribuer à un mauvais pronostic (215). Le SRAS-CoV-2 peut aussi interagir directement avec les CE vasculaires (216,217). Plusieurs facteurs de risque de maladies cardiovasculaires, dont le diabète, l'obésité, la dyslipidémie, le tabagisme et l'âge avancé, peuvent induire un dysfonctionnement de la CE. Ces différents facteurs de risque ont été retrouvés chez les patients développant une forme sévère de COVID-19 (218). En outre, un phénotype prothrombotique et une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ont été observés dans la COVID-19. Plusieurs études ont décrit une CIVD chez certains patients atteints de COVID-19. Dans l'étude de Fogarty *et al.* (219), la CIVD était rare et apparaissait au stade avancé de la maladie. Dans deux autres études (220,221), la CIVD était plus fréquente chez les patients avec un mauvais pronostic. Cette CIVD est secondaire à l'affection à SARS-CoV-2 et reflète le dysfonctionnement de la CE. En effet, cet état favorise le développement de thrombose entraînant l'exposition du matériel sous-endothélial, qui va amplifier l'agrégation plaquettaire, l'activation de la thrombine et la production de fibrine (222). En revanche, chez les 24 patients de l'étude de Panigada *et al.*, développement d'une CIVD n'était pas associé à un mauvais pronostic (223). Dans ce contexte inflammatoire, les CE expriment à leur surface des récepteurs d'adhésion tel que le facteur von Willebrand. Tant *in vitro* qu'*in vivo*, il a été démontré que cette exacerbation de l'activation plaquettaire induisait des migrations de thrombi plaquettaires, et en conséquence une atteinte des tissus sains. Il s'en suit un recrutement des leucocytes circulants par l'intermédiaire de la P selectine qui interagit avec les récepteurs PSGL 1 des monocytes (224). De plus, le sepsis favorise l'hyperactivation des plaquettes, majorant le syndrome de détresse respiratoire aiguë et l'insuffisance rénale aiguë (225,226).

3.1.2. Réponse immunitaire et atteinte tissulaire

Les leucocytes jouent un rôle important dans la pathogenèse du SRAS-CoV-2. L'examen histologique de cas graves d'infection à SARS-CoV-2, a en évidence des infiltrats inflammatoires mononucléaires interstitiels pulmonaires dominés par les lymphocytes (227). La réponse inflammatoire systémique de la COVID-19, appelée "orage cytokinique", expose l'endothélium à des cytokines pro-inflammatoires, qui induisent la production des molécules d'adhésion et des chimiokines, entraînant le recrutement de leucocytes et l'inflammation (228). Ce processus peut également entraîner la mort de la CE, qui contribue à augmenter la perméabilité vasculaire et à endommager les organes. L'endothélium peut constituer une source importante de cytokines pro-inflammatoires, par exemple l'IL1 et l'IL-6, qui caractérisent la tempête de cytokines dans la COVID-19 (229,230). L'immunité T cytotoxique prend

une grande part dans la survie des patients (231). Dans le cas du SRAS-CoV-2, l'augmentation de l'inflammation dépendante des anticorps joue un rôle dans l'activation et la pathologie de la CE. Ce phénomène est démontré dans des modèles expérimentaux d'infection par le SRAS (232). Il est à noter que les résultats de l'étude RECOVERY, avec de faibles doses de dexaméthasone, permettent de diminuer cette orage cytokinique, et d'améliorer la survie (233).

3.2. COVID-19 et thrombose

3.2.1. Thrombose veineuse

Les premières études sur la COVID-19 ont décrit une l'élévation des D-dimères et des produits de dégradation de la fibrine. Il a été démontré que les niveaux de D-dimères > 1000 µg/L étaient associés à une mortalité hospitalière augmentée au cours de la COVID-19 (234) . Les premières publications au début de l'épidémie en Chine faisaient état de 25% d'évènements thromboemboliques chez les patients admis en unités de soins intensifs au cours de l'infection (235). La mise en place d'une anticoagulation préventive n'était pas encore recommandée à l'époque. Il a été décrit des concentrations plasmatiques de D-dimères plus augmentés chez les patients développant une embolie pulmonaire(236). Dans une cohorte de 184 patients en unité de soins intensifs, l'incidence cumulée des évènements thromboemboliques veineux était de 27 (15 % du total), malgré une thromboprophylaxie (237,238). Lors du suivi de ces patients, 40 évènements supplémentaires ont été décrits. Il faut noter que les patients avaient souvent une thrombose veineuse asymptomatique, malgré l'anticoagulation. En effet, une étude a rapporté un taux global d'évènements thromboemboliques veineux de 69 % en prenant en compte les formes asymptomatiques et les suspicions clinique (239). Une autre étude a aussi démontré 20% d'embolie pulmonaire asymptomatique en unité de soins intensifs (240).

3.2.2. Thrombose artérielle

Une augmentation des évènements thrombotiques a été décrite dans l'infection à SRAS-CoV-2. Dans une série de 184 patients allemands atteints d'une forme grave de COVID-19, 7 ont développé des évènements thrombotiques artériels, dont 5 étaient des accidents vasculaires cérébraux ischémiques et les 2 autres des embolies artérielles systémiques (237). Les patients avaient tous une thromboprophylaxie préventive. Dans une série plus importante en Italie, 13 patients sur 362 ont développé des signes de thrombose artérielle se manifestant par un accident vasculaire cérébral et un infarctus du myocarde, dont la moitié a été diagnostiquée sur les premières 24 heures d'hospitalisation (241). D'autres cas de thromboses artérielles atypiques ont été décrits, pourtant les patients avaient un faible risque thrombotique et une thromboprophylaxie.

3.3. Prédiction d'aggravation aux cours du COVID-19

La forte contagiosité du SARS-CoV-2 et le grand nombre de patients hospitalisés en unités de soins intensifs ont rapidement permis de développer des scores prédictifs. La plupart de ces scores prédisent le décès des patients. Les scores pré existant d'aggravation d'une pneumonie A-DROP et , CURB-65 ont déjà été évalués (242). La plupart des scores associe l'âge (243), les comorbidités (244), les anomalies radiologiques, la saturation en oxygène (218).

Parmi les critères biologiques, la CRP, l'urée, la procalcitonine (245), mais aussi la lyse cellulaire par mesure de la lactate déshydrogénase semblent être les plus pertinents. Parmi toutes ces études, peu se sont intéressées aux critères hématologiques et au risque de transfert dans une unité de soins intensifs lorsque le patient est hospitalisé en unité conventionnelle « COVID-19 ».

III- Le test de génération de thrombine

La thrombine est l'enzyme clé de la coagulation. Les tests utilisés en routine (temps de quick (TQ) et temps de céphaline plus activateur (TCA)) sont standardisés pour permettre une évaluation globale de la coagulation en explorant les voies endogène et exogène de la coagulation, mais ces tests sont mis en défaut car la réaction s'arrête quand le caillot est formé (5% de thrombine formée) et ils n'évaluent pas le potentiel activateur et inhibiteur de la thrombine dans la coagulation.

Le test de génération de thrombine (TGT) est un test qui a plus de 50 ans. Il était utilisé avant l'apparition du TQ et du TCA pour évaluer les maladies hémorragiques (246). L'évolution technologique et de meilleures connaissances de la coagulation ont contribué à faire renaître cette technique. L'équipe de Hemker a contribué à cette réutilisation en automatisant la méthode (calibrated automated thrombogram (CAT)) (Figure 11), en utilisant un substrat fluorescent permettant de quantifier facilement la thrombine, et un calibrateur permettant de mesurer l'activité enzymatique et de la convertir en quantité de thrombine (247).

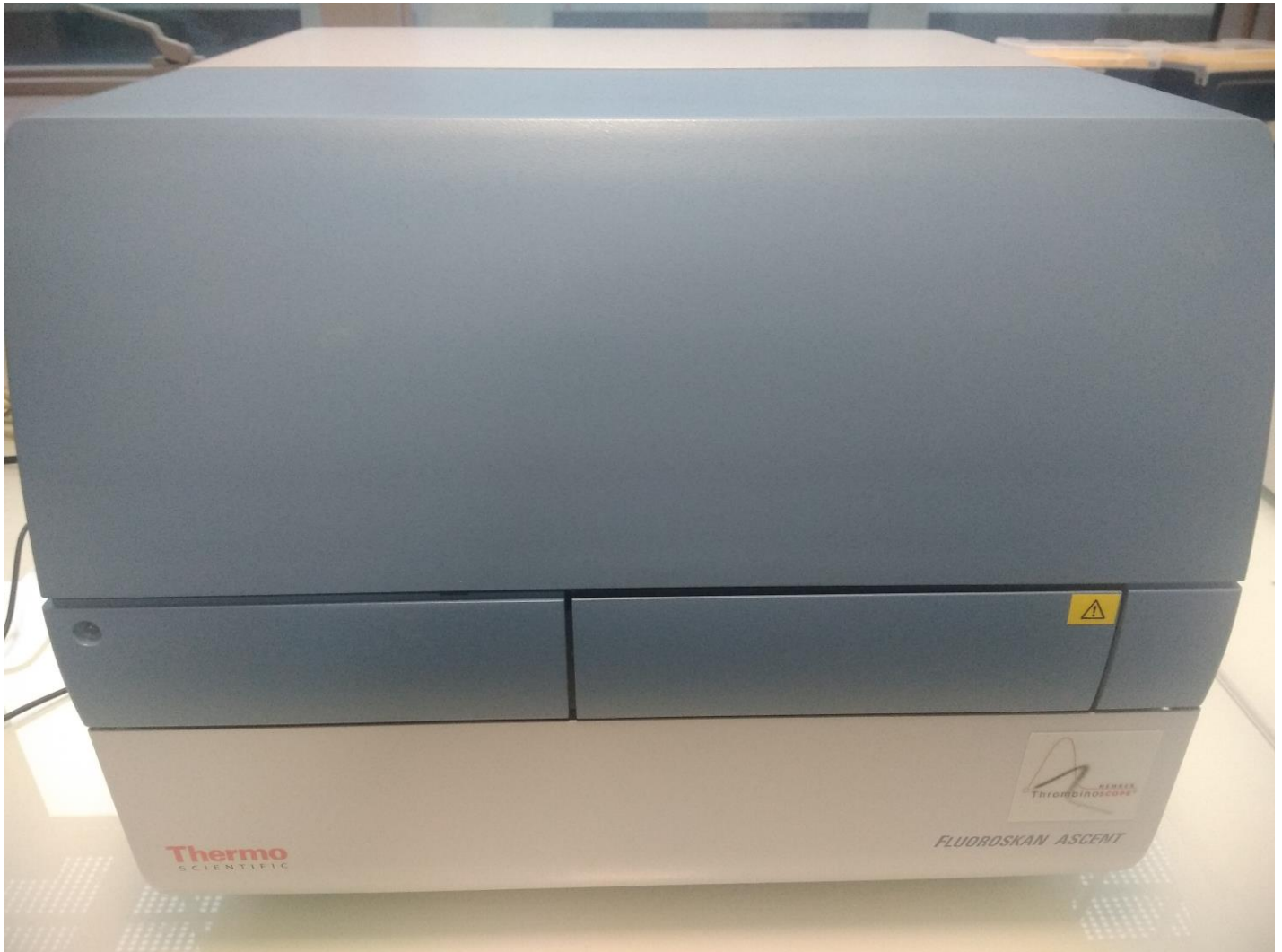


Figure 11. Calibrated automated thrombogram

1. Principe du test de génération de thrombine

Le TGT peut se faire sur plasma pauvre en plaquettes (PPP) ou sur plasma riche en plaquettes (PRP). Le plasma est mis au contact soit d'un activateur de la coagulation (FT±PL), soit d'une quantité fixe de calibrateur. La réaction commence lorsque l'automate distribue un mélange de calcium et de substrat fluorescent (Figure 12). Le substrat spécifique, l' amino-méthyl-coumarine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) est clivé par la thrombine formée et converti en niveau de fluorescence. L'utilisation d'un calibrant permet de s'affranchir de plusieurs paramètres pouvant modifier les résultats :

- La présence d'un complexe α_2 macroglobuline-thrombine. Ce complexe ajouté en quantité connue permet de palier à l'action de l' α_2 macroglobuline (α_2 M) présente dans le plasma du patient et permet ainsi de déduire la part non physiologique de thrombine liée à l' α_2 M et également, de corriger les effets de consommation du substrat et de filtre interne
- La présence d'AT et d'héparine, empêchant la coagulation

- La consommation de substrat, les variations de « qualité » du plasma (ictère, lactescence) et l'usure de la lampe.

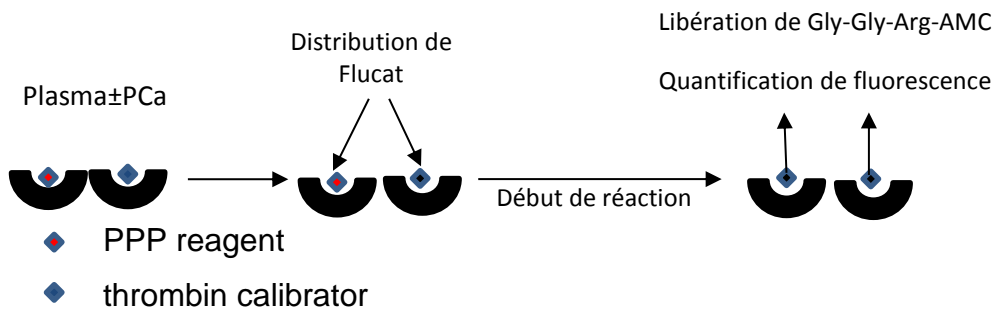


Figure 12. Méthodologie de la génération de thrombine

2. Mesure et correction du logiciel

2.1. Correction de l'effet filtre

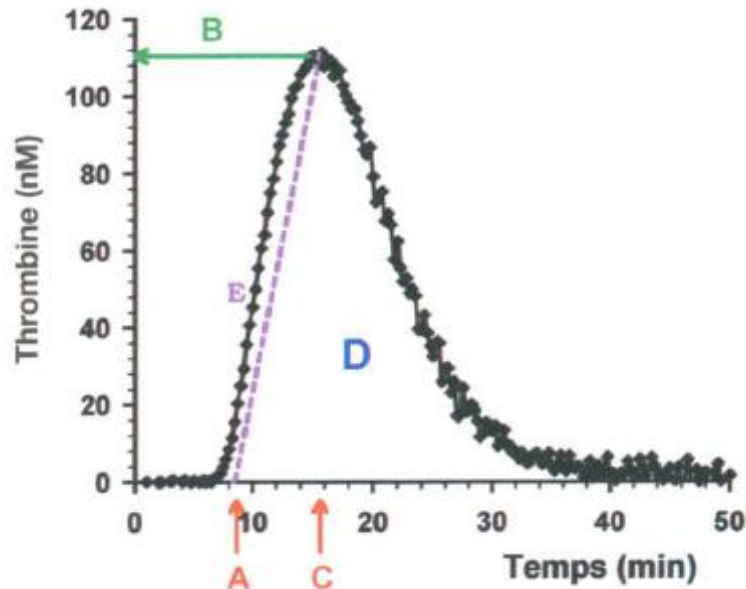
Des corrections sont effectuées par le logiciel afin d'éviter la sous-estimation de la thrombine formée. La réaction dans les puits du calibrateur, permet d'obtenir comme seule activité enzymatique la conversion du substrat. La cinétique de transformation et d'émission du fluorophore devrait être linéaire, mais la consommation de substrat, déposé en quantité fixe, diminue cette production et si la thrombine formée est trop importante, le fluorophore est produit en trop grande quantité et la mesure de fluorescence est sous-estimée (effet filtre). Le programme corrige et transforme la courbe non linéaire de fluorescence en une droite.

2.2. Dérivée primaire de fluorescence corrigée

La dérivée primaire est la courbe de fluorescence obtenue après correction de l'effet filtre et la consommation de substrat. L'activité $\alpha 2M$ /thrombine est toujours présente. Elle représente la fluorescence par minute.

2.3. Correction de l'activité $\alpha 2M$ /thrombine

La thrombine forme physiologiquement un complexe avec son inhibiteur principal, l'AT. Une partie de la thrombine générée se lie à l' $\alpha 2M$ et possède la capacité de continuer à convertir le substrat fluorogénique. La conversion du substrat va continuer alors que la thrombine n'est plus produite. Il en résulte un décalage de la courbe avec modifications des données du thrombinogramme. Le logiciel corrige les résultats en prenant en compte l'activité $\alpha 2M$ -thrombine et en la soustrayant à l'activité thrombine+ $\alpha 2M$ -thrombine.



(A) Phase d'initiation (min) ; (B) Concentration maximale en thrombine (nM) ; (C) Temps pour atteindre la concentration en thrombine maximale (min) ; (D) Potentiel endogène de thrombine (ETP) (nM.min) ; (E) Pente maximale de génération de IIa (nM/min).

Figure 13. Paramètres du thrombinogramme

Le test de génération de thrombine fait apparaître une courbe ou profil : le thrombinogramme avec plusieurs paramètres pour le définir (Figure 13)

- Temps de latence, exprimé en minutes. Il correspond à la phase de formation du caillot et de génération de thrombine. C'est ce qui est mesuré lors d'un TQ et TCA
- Pic, exprimé en nM. C'est la quantité maximale de thrombine générée
- Temps au pic, exprimé en minutes. C'est le temps nécessaire à atteindre la concentration maximale de thrombine
- Potentiel endogène de thrombine (ETP), exprimé en nM.min. Aire sous la courbe représentant la quantité totale de thrombine formée pendant le test
- Vitesse ou index de propagation, exprimé en nM/min. Elle est calculée à partir de la formule
$$\text{formule} = \frac{\text{Pic}}{\text{Temps au pic} - \text{temps de latence}}$$
 et représente la cinétique de formation de thrombine

Ces différents paramètres permettent la distinction entre les profils normaux, hypocoagulables ou hypercoagulables (Figure 14).

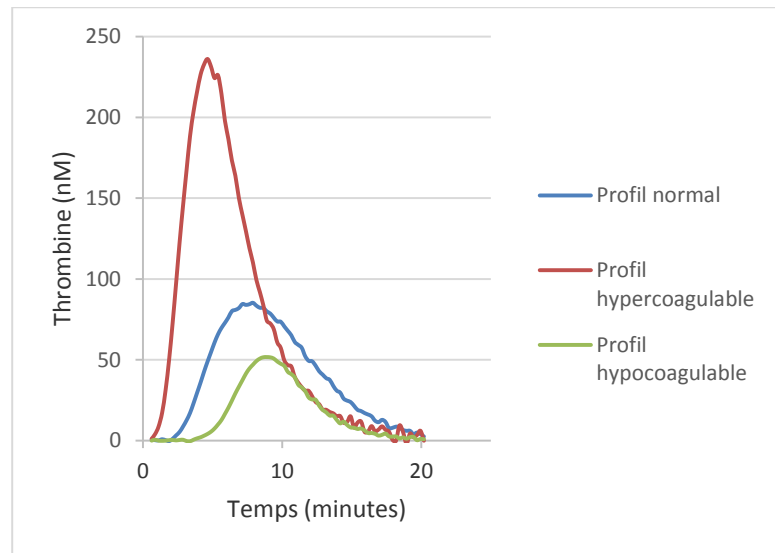


Figure 14. Profil de coagulation dans le TGT

3. Aspect méthodologique

Depuis l'utilisation du substrat fluorogénique permettant une automatisation de la technique, de nombreuses études ont été faites pour évaluer l'intérêt du TGT dans la mise en évidence du risque thrombotique et hémorragique. Le nombre d'essais cliniques étant en augmentation, une standardisation des protocoles a été nécessaire pour comparer les études. Y. Dargaud a mené une étude multicentrique, à laquelle le laboratoire d'hémostase du CHU de Rouen a participé, pour comparer les méthodes et réactifs utilisés pour évaluer les pratiques des différents centres et tenter de donner des recommandations (248). Les résultats de cette étude ont montré que le meilleur moyen de standardiser la technique est d'utiliser un témoin interne du laboratoire.

3.1. Le type de tube

Il existe de nombreux facteurs pouvant influencer les résultats du TGT. Parmi les conditions pré-analytiques pouvant interférer, l'utilisation d'un tube Monovette© diminue les différents paramètres mesurés comparé à un tube Vacutainer©. Cette différence est due à la différence de pression dans les tubes.

3.2. La concentration en FT

L'adjonction d'un inhibiteur de la phase « contact », le « corn trypsin inhibitor », permet de diminuer l'influence du FT recueilli lors du prélèvement. De faibles concentrations en FT (1 pM) se rapprochent des conditions physiologiques alors que de plus fortes concentrations influencent la taille du pic et le temps de latence (249). Les fortes concentrations sont principalement utilisées pour évaluer la voie exogène ou étudier des prélèvements de patients traités par anticoagulants.

3.3. La concentration en PL

La présence de PL est indispensable à la réalisation du TGT. Les PL peuvent être directement présents lorsque le test se fait sur plasma riche en plaquettes par des mécanismes de flip flop extériorisant les PL des plaquettes. Les PL ne sont alors pas nécessaires pour le TGT sur PRP, ils sont apportés par les plaquettes.

Dans le cas du plasma pauvre en plaquettes, l'ajout de PL synthétiques ou des microvésicules plaquettaires est indispensable. Selon Gerotziafas *et al*, une concentration égale ou supérieure à 4 µM de PL synthétiques permettrait d'obtenir un effet seuil et une reproductibilité des résultats (250). Des concentrations plus faibles en PL diminuent tous les paramètres du thrombinogramme ; l'apport en PL étant indispensable à l'action des facteurs vitamine K dépendants.

3.4. Evaluation de la RPCa

Le TGT permet aussi d'évaluer de façon dynamique les processus inhibiteurs de la coagulation. L'adjonction de TM ou de PCa à la réaction permet d'évaluer la cinétique et de mettre en évidence une RPCa comme dans le cas de la mutation Leiden du FV. Les conditions standards ne permettent pas d'évaluer pleinement l'action de la PCa, par absence de paroi vasculaire dans le milieu réactionnel où est fixé la TM qui est indispensable à l'activation de la PC.

IV-TGT et dysfonction endothéliale

1. Modèle clinique d'évaluation de la dysfonction endothéliale par le TGT

1.1. Facteurs de risque de thrombose et TGT

1.1.1. Thrombose veineuse

1.1.1.1. Vieillesse

L'incidence de la maladie thromboembolique veineuse (MTEV) augmente avec l'âge. L'augmentation de la génération de thrombine est également observée avec l'âge (251). Dans une étude réalisée chez les personnes âgées, l'augmentation du temps de latence a été associée à la thrombose (252).

1.1.1.2. Obésité

L'obésité est définie par un indice de masse corporelle (IMC) > 30 kg/m² et constitue un facteur de prédisposition majeur aux thromboses artérielles et veineuses (253). En ce qui concerne la génération de thrombine, Fritsch *et al*. ont observé une augmentation du fibrinogène et de l'ETP chez les enfants en surpoids (254). L'ETP était corrélée à l'IMC, mais pas au syndrome métabolique (MetS). La relation

entre l'IMC et l'augmentation de la génération de thrombine a également été signalée chez les adultes sans thrombose par Campello *et al.* (255) et avec les événements thrombotiques par Sonnevi *et al.* (256). L'étude de Campello *et al.* a démontré que la génération de thrombine est associée à la quantification de microvésicules (MV). La sévérité de l'obésité était corrélée avec la génération de thrombine et les MV procoagulantes (MV plaquettaires, MV endothéliales). Les mêmes résultats ont été démontrés dans l'étude Sonnevi (256) avec une corrélation de l'ETP et de l'augmentation du pic, liée aux marqueurs inflammatoires. Cependant, ces deux études n'étaient pas comparables. Tout d'abord, les conditions du TGT étaient différentes (5 pM de FT dans l'étude de Campello, 1 et 10 pM de FT dans l'étude de Sonnevi). De plus, la génération de thrombine était augmentée avec les antécédents de thrombose dans l'étude Sonnevi.

Inversement, l'impact de la perte de poids a été évalué dans l'étude de Ay *et al.* (257). Une diminution des paramètres pro-coagulants (FT, PAI-1, ETP) et de l'insulinorésistance après une chirurgie bariatrique a été observée. Une étude récente a confirmé les résultats avec une diminution globale des marqueurs de la génération de thrombine et une augmentation de la fibrinolyse après *bypass* (258). Dans une étude basée sur la Gutenberg study, une augmentation de l'ETP est associée à l'obésité, et une augmentation de la mortalité est associée au temps de latence (HR=1,46, [95% CI : 1,07 ; 2,00]) et à l'ETP ((HR=1,50, [95% CI : 1,06 ; 2,13]) (259). Ces différentes études ont été réalisées sur PPP.

1.1.1.3. Développement de la thrombose

Deux études ont évalué le développement de thrombose veineuse chez des patients ayant des antécédents de thrombose artérielle. Dans l'étude de Cate Hoek *et al.* (260) et dans une l'étude LITE (longitudinal investigation in thromboembolism etiology) de Lutsey *et al.* (261), les patients présentant une MTEV idiopathique avaient un pic de thrombine augmenté (OR=1,78 (1,26-2,51)). Ces deux études ont été réalisées sur PPP.

1.1.1.4. Thrombose récidivante

Sept études ont évalué le rôle de la génération de thrombine pour évaluer le risque de récurrence thrombotique. La première, menée par Hron *et al.*, a démontré un risque de récurrence si le pic de thrombine était supérieur à 400 nM. Après quatre ans, le risque était de 6,5 % si le pic était inférieur à 400 nM et de 20 % s'il était supérieur (262). Deux études de Van Hycklama ont montré que la récurrence n'était pas corrélée aux paramètres du TGT (263,264) et la deuxième étude a montré un risque de développer un premier événement thrombotique si le TGT était augmenté mais aussi que les D-dimères étaient plus sensibles pour détecter la récurrence thrombotique. Besser *et al.* ont confirmé qu'un ETP plus élevé (>1489 nM.min) engendrait un risque de récurrence avec un risque relatif de 2,9 à 4 ans si le premier événement n'était pas provoqué (265). Sonnevi *et al.* sont parvenus à la même conclusion (266). Lorsque le TGT a été effectuée en présence de protéine C activée, les patients présentant un

ETP et un pic >75e percentile avaient un HR respectivement de 6,3 et 4,2 de récurrence thrombotique. Une autre étude réalisée par Eisenger *et al.* a évalué l'ETP et les D-dimères après l'arrêt de l'anticoagulation (267). Après ajustement avec les D-dimères, l'âge et le sexe, le risque de récurrence restait plus élevé en cas d'augmentation de l'ETP [HR : 1,6 (95% CI ; 1,01-2,4)]. La dernière étude de Chaireti *et al.* apportait des résultats contradictoires par rapport à Hron. Un faible pic après l'arrêt de l'anticoagulation était associé à une récurrence (268). Il est à noter que la méthodologie entre ces différentes études n'est pas standardisée, avec différentes concentrations de FT, PL, et l'utilisation de différents automates, ce qui peut expliquer les résultats non concordants. Ces différentes études ont été réalisées sur PPP.

1.1.2. Thrombose artérielle et facteurs de risque cardiovasculaire

2.1.2.1 Diabète

Les patients diabétiques avaient également un profil de TGT modifié selon Kim *et al.* (269). Une augmentation de l'ETP a été observée dans le groupe de diabétiques avec une diminution lorsque des traitements par des statines ou des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine étaient instaurés. Une explication possible était le potentiel pro-inflammatoire du diabète de type 2 et un ETP plus élevé en relation. Aucune étude n'a été réalisée sur l'hypertension artérielle ou chez les tabagiques.

2.1.2.2. Thrombose artérielle

Le risque de syndrome coronarien aigu (SCA) augmente avec les facteurs de risque cardiovasculaires, sans augmentation du risque de thrombose veineuse profonde (270). Orbe *et al.* ont démontré une génération de thrombine plus élevée dans le SCA par rapport à l'angor stable (271). D'autres études ont confirmé l'augmentation du TGT à la phase aiguë du SCA (272,273). Smid a mené deux études sur l'infarctus myocardique, l'une immédiatement après un SCA (274), l'autre après 3 à 9 mois (275). L'ETP et le pic sont restés plus élevés pendant 6 mois après le SCA, mais n'ont pas permis de prédire le risque de récurrence artérielle (274). Les résultats ont été confirmés dans une deuxième étude sans association claire entre le SCA et la RPCa (276). Dans les deux études, des concentrations différentes de FT ont été utilisées pour déclencher la réaction et en conclusion, une faible concentration de FT (1 pM) était plus sensible pour détecter une lésion vasculaire. De façon surprenante, deux études ont décrit une augmentation des décès par accidents cardiovasculaires (276) ou des événements thrombotiques après une angioplastie (277) associée à des paramètres de TGT plus faibles. Hansen *et al.*, ont également démontré une diminution des événements thrombotiques associés à un ETP plus élevé pendant un SCA (risque relatif ajusté : 0,682, p=0,038) (278). Cependant, il y avait un biais méthodologique dans cette étude, induit une centrifugation des échantillons à 4°C. La basse température induit une activation de l'hémostase *in vitro* et éventuellement de faux résultats. Pour les

accidents vasculaires cérébraux, une étude de cohorte prospective n'a pas montré d'intérêt du TGT (279). Mais des résultats contradictoires ont été décrits dans une étude de cohorte prospective de 9 000 sujets. Une augmentation du TGT était associée à un risque d'accident vasculaire cérébral ischémique aigu, qui était plus élevé chez les femmes (280). Cependant, l'hémorragie intra-plaque n'était pas associée à une modification du TGT (281). Les différentes études ont été réalisées sur PPP. En conclusion, plusieurs études ont démontré des résultats paradoxaux dans les maladies cardiovasculaires.

1.2. Maladie auto-immune

1.2.1. TGT et syndrome des antiphospholipides

Le SAPL est un syndrome clinico-biologique associant la persistance d'aPL et un évènement vasculaire de type thrombotique et/ou une morbidité obstétricale. La physiopathologie du SAPL suit la théorie du "two hit trigger", c'est-à-dire la présence d'anticorps antiphospholipides et une agression aiguë (infection, cancer...) provoquant une dysfonction endothéliale. L'atteinte endothéliale va secondairement induire un état d'hypercoagulabilité (282) et une résistance à la protéine C activée (RPCa), qui a été démontrée au niveau cellulaire (283) et au niveau plasmatique par TGT(96). Cette RPCa est retrouvée chez les patients porteurs d'un SAPL thrombotique avec persistance d'un lupus anticoagulant en comparaison à des patients porteurs sains d'un lupus anticoagulant sans évènement clinique (284). Dans une étude comparant 50 patients SAPL anticoagulés avec 50 patients anticoagulés pour thrombose veineuse profonde mais sans SAPL, la seule différence observée est une augmentation du lag time (induit par les aPL) sans modification de l'ETP, lorsque le traitement par AVK est dans le range thérapeutique.

L'étude Rivaroxaban in Antiphospholipid Syndrome (127) évaluait la possibilité de traiter les patients atteints de SAPL avec un anticoagulant oral direct en comparaison au traitement de référence que sont les AVK. La comparaison de différents marqueurs d'hypercoagulabilité entre le groupe traité par Rivaroxaban et le groupe traité par Warfarine a montré un ETP plus élevé (1086 nM.min contre 548 nM.min) et des F1+2 plus élevés (93,6 nM contre 45,6 nM). En revanche, dans le groupe rivaroxaban le pic de thrombine était plus faible (55,6 nM contre 85,7 nM). La différence entre les deux traitements est due à leur mécanisme d'action. Les AVK diminuent la synthèse de prothrombine et par conséquent la thrombine formée, expliquant un ETP plus faible, alors que le rivaroxaban va inhiber le facteur X activé et retarder la formation de thrombine.

Par ailleurs, deux études se sont intéressées à la prédiction de thrombose dans ce contexte. La première a montré que le TGT n'était pas optimal pour prédire la thrombose: l'association d'une persistance d'aPL et d'une RPCa avait une sensibilité de 0,72 et une spécificité de 0,62 comme marqueurs prédictifs. Les critères cliniques étaient plus spécifiques (hypertension, thrombose

artérielle)(285). La seconde étude trouve une corrélation forte entre le risque de récurrence thrombotique, la présence d'anti-domaine I de la β 2-glycoprotéine I et une RPCa mesurée par le TGT (HR, 3.90 [95% CI, 1.33–11.46], $p= 0.01$; HR, 4.98 [95% CI, 1.36–18.28], $p= 0.02$ respectivement) (286). Ces deux études ont été réalisées sur PRP.

1.2.2. TGT et Lupus Erythémateux Systémique

L'activation de la coagulation a été décrite dans le LES. Des D-dimères élevés ont été décrits comme étant associés à la sérite lupique(287). Une étude des mêmes auteurs a aussi décrit une association entre D-dimères et activité de la maladie (288). Ils nécessitaient cependant d'être associés à la mesure du C4 pour un meilleur pouvoir discriminatoire. Le TGT a été étudié dans quelques travaux qui se sont intéressés au LES. Une première étude a démontré une augmentation de génération de thrombine associée à une hypercoagulabilité et une présence de phospholipides plaquettaires(289). Cette augmentation n'était pas corrélée à l'activité de la maladie. Certains auteurs ont démontré la présence d'une RPCa dans le LES (290). Dans cette étude, seule la RPCa était mise en évidence comme marqueur d'hypercoagulabilité, les D-dimères étaient augmentés non significative et les F1+2 étaient diminués par rapport au groupe contrôle. A noter que la RPCa n'était pas associée à un SAPL secondaire. Deux études contradictoires se sont intéressées au TGT comme marqueur éventuel d'activité de la maladie. La première, sur 22 patients avec un Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) médian de 6,0 [3,5-8,0], a retrouvé un ETP diminué dans le groupe LES comparé au groupe contrôle, et le reste des paramètres du TGT équivalents (291). La seconde a inclus 60 patients et a dichotomisée les patients à faible activité de maladie (SLEDAI \leq 4, N=30) et ceux à activité modérée (SLEDAI $>$ 4, N=30). Dans cette étude, les différents paramètres du TGT sont augmentés dans les 2 groupes par rapport au groupe contrôle et l'ETP est augmenté dans le groupe à activité modéré vs faible activité de LES (292). Les D-dimères étaient aussi augmentés dans le groupe SLEDAI $>$ 4, mais n'était cependant pas corrélés à l'activité de la maladie. La différence de résultats entre les 2 études découle des critères d'inclusion des patients et de la méthodologie utilisée pour effectuer le TGT, la seconde utilisant une concentration plus faible de FT, plus adaptée à l'évaluation globale de la coagulation et à l'atteinte vasculaire (249). Les différentes études ont évaluées la génération de thrombine avec du PPP.

1.2.3. TGT et polyarthrite rhumatoïde

Il est décrit un risque accru de morbidité et de mortalité cardiovasculaires dans la polyarthrite rhumatoïde (293). Dans cette maladie inflammatoire, les marqueurs d'activation de la coagulation (D-dimères, F1+2) sont associés à l'inflammation et diminuent après une prise en charge thérapeutique (294). Une étude s'est intéressée à l'impact de la ménopause sur la génération de thrombine dans la

PR. Cette étude a comparé 14 patients contrôles, 34 patientes contrôles ménopausées, 11 patientes avec une PR et 31 patientes avec une PR ménopausées. La seule différence observée est un ETP plus faible dans le groupe contrôle des femmes non ménopausées par rapport aux autres groupes (295). Deux études se sont intéressées aussi au TGT comme marqueur éventuel de l'activité de la maladie. Dans la première étude, l'ETP, le temps de latence et le temps au pic étaient diminués et la vélocité augmentée (296). Dans la seconde étude, les résultats étaient contradictoires (297): l'ETP, le peak et la vélocité étaient augmentés, le temps de latence et le temps au pic étaient allongés. Les marqueurs du TGT étaient corrélés au Disease Activity Score 28. De plus, cette corrélation n'était pas dépendante de l'ancienneté de la maladie, l'âge ou la C –réactive protéine, mais dépendante de l'augmentation du facteur VIII et du tissue factor pathway inhibitor. Le facteur VIII et le tissue factor pathway inhibitor sont des protéines qui augmentent lors de l'inflammation, ce qui peut expliquer leur impact sur le TGT chez les patients ayant une maladie active. Il est à noter qu'aucune étude ne s'est intéressée à l'impact du traitement de la PR sur l'hypercoagulabilité. Les différentes études ont évaluées la génération de thrombine avec du PPP.

1.2.4. TGT et vascularites

La maladie de Behçet (BD) est une maladie inflammatoire systémique rare, avec une atteinte endothéliale et une thrombogénicité associée (298). Deux études contradictoires se sont intéressées au lien entre l'activité de la maladie et le TGT. Dans la première, l'ETP et la vélocité étaient augmentés dans le groupe maladie de Behçet en comparaison au groupe contrôle, mais sans corrélation avec l'activité de la maladie (299). Les D-dimères n'étaient pas différents du groupe contrôle. Dans la seconde étude, les auteurs ont comparé la génération de thrombine entre BD inactive et active. La génération de thrombine était supérieure dans le groupe BD active et dépendante de la netose(300). Cette différence entre les deux études peut s'expliquer par la différence entre les groupes de patients BD étudiés. Dans la première, il s'agissait de patients avec une maladie active comparés à des sujets contrôles, alors que dans la seconde, tous les sujets étaient des patients porteurs de BD et la comparaison se faisait sur le caractère actif ou pas de la maladie. D'autres auteurs se sont intéressés à la BD sous traitement anticoagulant pour thrombose (301). Les BD avec antécédent de thrombose avaient un ETP augmenté par rapport à ceux sans antécédent thrombotique. Sous traitement par AVK, les patients BD avaient une génération de thrombine équivalente à celle de patients sous AVK pour fibrillation auriculaire donc sans contexte d'hypercoagulabilité.

Il a été démontré dans les vascularites à ANCA une persistance de l'augmentation de l'ETP après diagnostic, quel que soit le traitement utilisé (corticoïde, azathioprine, methotrexate) (302). Les D Dimères n'étaient pas différents du groupe contrôle dans cette étude.

Dans la granulomatose éosinophilique avec polyangéite, le TGT et la formation du caillot de fibrine ont été étudiés. Une augmentation du pic de thrombine a été retrouvée; elle est corrélée à un défaut de fibrinolyse chez les patients en comparaison au groupe contrôle, sans être corrélée à l'activité de la maladie ou au traitement des patients (303).

Une étude dans la maladie de Kawasaki a démontré une augmentation de l'ETP avant traitement et une diminution à 4 semaines post perfusion d'immunoglobulines polyvalentes (304). Néanmoins, la diminution ne permet pas de retrouver un état de coagulabilité normal. Il n'y avait, cependant, pas de différence entre les sujets répondeurs et non répondeurs. Les différentes études ont évaluées la génération de thrombine avec du PPP.

1.2.5. TGT et thrombocytopénie immunologique

La thrombocytopénie immunologique peut être associée à des événements thrombotiques (305). Des auteurs ont démontré une augmentation de génération de thrombine chez des patients atteints de thrombocytopénies immunologiques. Cette augmentation était secondaire à une RPCa. Il faut noter que tous les patients ont été traités par corticoïdes, ce qui a pour effet d'augmenter les facteurs de la coagulation et par conséquent le TGT (306). L'utilisation d'agonistes de la thrombopoïétine ne modifient pas le TGT (307).

Objectif

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'évaluer l'intérêt du test de génération de thrombine dans différents modèles de dysfonction endothéliale :

- Le premier modèle auquel nous nous sommes intéressés est un modèle de dysfonction endothéliale subaiguë : le SAPL. Pour ce modèle trois études ont été menées :
 - le développement d'un modèle cellulaire de SAPL et l'évaluation de l'hypercoagulabilité sur ce modèle cellulaire grâce au test de génération de thrombine
 - L'évaluation, par le TGT de la réponse à différents traitements pharmacologiques (hydroxychloroquine, traitement restaurant le glycocalyx) dans un modèle cellulaire et un modèle murin de SAPL.
 - L'évaluation grâce au TGT de l'état d'hypercoagulabilité chez des patients atteints de différents types de SAPL.
- Il nous a ensuite sembler intéressant de comparer l'intérêt du TGT chez des patients ayant une dysfonction endothéliale différente en choisissant
 - Un modèle de dysfonction endothéliale chronique : la fibrose pulmonaire idiopathique et la réponse aux différents traitements de cette maladie.
 - Un modèle de dysfonction endothéliale aiguë : l'infection à SARS-CoV-2.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Modèles cellulaire et animal de dysfonction endothéliale

1. Modèles cellulaires de dysfonctions endothéliales

1.1. Cellules endothéliales aortiques

1.1.1. *Culture de cellules endothéliales aortiques*

Les cellules endothéliales aortiques immortalisées (HAEC) (TeloHAEC ; ATCC CRL-4052, USA) ont été cultivées en milieu de culture EGM-2 (ATCC PCS-100-041, USA) additionné par 10 unités/ml de pénicilline et 10 µg/ml de streptomycine (P4333, Sigma Aldrich, France) à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂. Les cellules adhésives ont été cultivées dans des flacons de culture de 75 cm². À 90 % de confluence, les cellules étaient incubées avec de la trypsine pendant 5 minutes à 37°C, puis une solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (PBS) + 5% de sérum de veau fœtal SVF ont été ajoutés pour neutraliser la trypsine. Les suspensions de cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 150 g et le culot cellulaire était remis en suspension dans le milieu de culture. Les cellules ont étéensemencées et la confluence était de 80 à 90 % dans chaque puits.

1.1.2. *Traitement des cellules endothéliales aortiques*

Pour tester les effets des aPL sur les HAEC, les cellules ont été remises en suspension à une densité de 5000 cellules/puits dans le milieu EGM-2 et incubées avec différentes concentrations d'aPL (100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml) sans ou avec HCQ (1 µg/ml), ou un contrôle négatif (IgG non spécifiques (IgG NS) ; 100, 500 µg/ml) (282) pendant 4 heures sur 37°.

Pour évaluer l'impact d'une modulation du glycocalyx sur les HAEC, les cellules ont été remises en suspension à une densité de 5000 cellules/puits dans le milieu et incubées avec l'aPL (100 µg/ml)

1.1.3. *Test de génération de thrombine sur HAEC*

Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits, à une densité cellulaire de 5000 cellules/puits, à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂. À 90 % de confluence, les cellules ont été incubées pendant 4 heures avec différentes concentrations d'aPL, d'aPL + HCQ ou des immunoglobulines polyvalentes non spécifiques (IgGNS). Les milieux de culture ont été retirés et 80 µl de PPP a été ajouté à chaque puit. La génération de thrombine a été initiée avec 1 pM ou 5 pM FT et 4 µM de PL. La génération de thrombine a été effectuée le même jour pour chaque condition, afin de réduire la variation de la production de thrombine due aux variations de confluence.

1.1.4. *Etude de l'expression de la thrombomoduline et ePCR par cytométrie*

La quantification de la thrombomoduline (TM) et du récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) (PE/Cy7 anti-CD141 et PE anti-CD201 respectivement, Biolegend) a été réalisée par cytomètre en flux (Naevios, beckman coulter).

1.2. Endothelial colony-forming cells

1.2.1. Isolement et culture d'ECFC

Le sang de cordon ombilical humain (CB) a été obtenu de l'Unité de thérapie cellulaire de l'Hôpital Saint-Louis (AP-HP, Paris). Les ECFC de sang de cordon ombilical, les ECFC des patients atteints de FPI et du sang périphérique d'adultes sains ont été isolées par un gradient de concentration Ficoll de cellules mononucléées :

- Les tubes héparinés étaient décantés dans un falcon contenant de l'histopaque
- Le falcon était centrifugé à 1200 g sans frein pendant 20 min
- Le plasma était éliminé
- L'anneau de cellules mononucléées était repris dans 50 ml de PBS+EDTA à 2mM
- Le falcon était centrifugé 400 g pendant 10 min
- Le surnageant était éliminé, le culot cellulaire était repris dans 25 ml de PBS+EDTA à 2 mM
- Le falcon était centrifugé 300 g pendant 10 min
- La densité cellulaire était calculée par un automate XN (Sysmex)
- Le falcon était centrifugé 200 g pendant 10 min
- Le culot était repris pour obtenir $5 \cdot 10^6$ par puits dans l'EGM-2+ 10% de SVF (Lonza, États-Unis)
- Les ECFC ont été déposées sur des plaques recouvertes de fibronectine (Merck, Allemagne) en utilisant l'EGM-2+10%SVF et utilisée entre les passages 3 à 6

1.2.2. Exploration des propriétés procoagulantes des ECFC par TGT

Le test de génération de thrombine a été réalisé sur ECFC. Les cellules ont été mis en culture sur plaque de 96 puits recouvertes de fibronectine et adaptées à la TGT (1500 cellules/puits). Après 3 jours, le milieu de culture a été retiré et 80 µl de plasma pauvre en plaquettes provenant de volontaires sains (cryocheck™ pooled normal plasma, Cryopep, France) ont été ajouté par puit. La TGT a été déclenchée avec différentes concentrations de FT pour faire la mise au point (1, 5 et 20 pM) (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France). L'ETP, le pic maximal, le lagtime et le TTP ont été

mesurés par le CAT et quantifiés par un Fluoroscan Ascent (Thermoscientific Labsystems, Helsinki, Finlande). L'expérience a été réalisée en double.

Le TGT a été réalisé sur les ECFC de sang de cordon, sur les ECFC de patients FPI et les ECFC de volontaires sains.

Les CB-ECFC ont été incubés avec :

- De la pirféridone (0,1-0,3-0,5 mg/ml)
- De la nintedanib (100-300 nM)
- Du treprostiniil (25-50-100 nM)
- De l'époprostenol (0,1-0,3-0,5 µg/ml)

1.2.3. Etude de la prolifération cellulaire par différents traitements

1.2.3.1. Quantification par comptage cellulaire

Les ECFC ont été ensemencés et le comptage a été réalisé de la façon suivante :

- Lavage des puits par du PBS sans Ca^{2+} et Mg^{2+}
- Ajout de trypsine et incubation pendant 1 min
- Ajout l'EGM-2+10%SVF
- Centrifugation 1200 g pendant 5 min
- Reprise du culot dans 1 ml
- Quantification par comptage manuel en cellule de kova après 24, 48 et 72 h d'incubation

Les ECFC ont été incubés avec :

- De la pirféridone (0,1-0,3-0,5 mg/ml)
- De la nintedanib (100-300 nM)
- Du treprostiniil (25-50-100 nM)
- De l'époprostenol (0,1-0,3-0,5 µg/ml)

1.2.3.2. Quantification par mesure de l'activité pNPP

Les ECFC ont été ensemencés et le comptage a été réalisé de la façon suivante :

- Lavage des puits par du PBS avec Ca^{2+} et Mg^{2+}
- Dépôt d'une solution de 3 mg/ml de pNPP
- Incubation 90 min à 37°C
- Arrêt de la réaction avec de la NaOH 1 N

- Lecture de la plaque à 405 nm

Les ECFC ont été incubés avec :

- De la pirfénidone (0,1-0,3-0,5 mg/ml)
- De la nintedanib (100-300 nM)
- Du treprostinil (25-50-100 nM)
- De l'epoprostenol (0,1-0,3-0,5 µg/ml)

2. Modèle murin de SAPL

L'unité INSERM U1096 a développé un modèle murin de SAPL en utilisant des immunoglobulines (Ig) purifiées à partir de plasma de patients ayant les critères de classification de Sydney. Les patients ont exclusivement des anti-β2GPI. Des plasmas de donneurs sains sont utilisés comme contrôle.

2.1. Purification des IgG

Les Ig sont purifiées sur colonne de chromatographie d'affinité protéine G sepharose (Nab prot G spin column, Fischer Scientific France) et resolubilisées dans une solution saline tamponnée de phosphate (PBS). Un dosage des IgG purifiées a confirmé la présence des anti-β2GPI. Les caractéristiques des patients SAPL "donneurs d'Ac" sont référencées dans le tableau. La concentration finale des sérums poolés, était considérée comme positive si elle était > 1860 CU en anti-β₂-GPI-IgG et <105 CU en aCLI IgG.

Patient	Clinique	aCL	Anti-β ₂ GPI	Lupus anticoagulant
1	AVC	110	599	négatif
2	SCA	90	2753	négatif
3	AVC	105	1056	négatif
4	AVC	0	4020	négatif
5	Thrombose artère rénale	115	658	négatif
6	AVC	36	429	négatif

Tableau 4. Caractéristiques cliniques des patients SAPL dont les IgG ont été purifiés

2.2. Préparation de l'hydroxychloroquine

Les comprimés d'HCQ (Plaquenil®, Sanofi Aventis, France) contenant 200 mg de principe actif sont broyés et solubilisés dans une solution de NaCl 0,9% concentrée à 1mg/ml.

2.3. Préparation des souris et recueil des échantillons

Des souris males C57BL/6 sont obtenues de Janvier (Le Genest Saint Isle, France) et gardées dans l'animalerie de la faculté de Médecine Pharmacie de Rouen. Les souris sont injectées soit avec des IgG purifiées anti-β2GPI (groupe SAPL), soit avec des IgG de donneurs sains (groupe contrôle). Les injections se font à l'aide d'une seringue à Insuline (29 G, Myjector® U-100 INSULIN) par voie intrapéritonéale. Les souris traitées par HCQ le sont par sonde gastrique de gavage à une dose 12µg/g.

Le prélèvement est réalisé dans la veine cave à J+7 après anesthésie par xylazine à 3,6mg/kg (Rompum 2%, Bayer, France) et 90mg/kg de kétamine (Imalgène 1000, Merial, France). La seringue de prélèvement contient 3,2 % de citrate trisodique (1/10 volume).

Le sang total est centrifugé 15 minutes à 2250g et le surnageant est centrifugé 15 min à 2250g pour obtenir le PPP. Le PPP est congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

2.4. Test de génération de thrombine sur le modèle murin de SAPL

La mise au point de la méthode dans le modèle murin de SAPL a nécessité de faire varier les concentrations en FT et PL (Tableau 15), la quantité de plasma et l'ajout de PCa.

Le protocole de préparation de plaques pour mesure a été le suivant :

- 20µl de mélange FT et PL (PPP reagent, Diagnostica Stago, Asnieres, France) ou 20µl de calibrant (Thrombin calibrator, Diagnostica Stago, Asnieres, France)

- ±10µl PCa a une concentration de 25 nM préparée à partir d'un concentré de PCa à 720 nM (don de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1116, Nancy, France)

- Ajout de PPP (20µl ou 80µl)

- Distribution de 20µl de FLUCAkit™(FLUCAkit™, Diagnostica Stago, Asnières, France) contenant le substrat fluorogénique (Z-Gly-Gly-Arg- AMC) et le chlorure de calcium pour démarrer le test

Chaque souris est passée en duplicate (2 puits par souris) et la mesure sur échantillon avec et sans PCa est effectuée sur la même plaque.

La mesure de la résistance à la PCa a été calculée et normalisée par la formule :

$$nRPCa = \frac{(\text{souris ETP +PCa} / \text{souris ETP -PCa})}{(\text{souris controle ETP +PCa} / \text{souris controle ETP-PCa})}$$

FT (en pM)	PL (en µM)
1	4
1.25	1
5	1
5	4

Tableau 5. Différentes concentrations en FT et PL utilisées

Le nombre de souris était de 4 dans le groupe contrôle, 4 dans le groupe SAPL+HCQ et 5 dans le groupe SAPL.

II- Populations étudiées

1. Populations étudiées

1.1. Patients SAPL

1.1.1. *Inclusion de patient SAPL*

Les patients SAPL sont prélevés au sein de l'unité d'Hémostase vasculaire ou dans le service de Médecine Interne lors de consultation de suivi. Les patients répondent aux critères de classification de Sydney (SAPL obstétrical ou thrombotique). Un groupe SAPL biologique a été inclus (persistance d'aPL sans évènement vasculaire).

Les patients sont regroupés en fonction du type de SAPL (obstétrical, thrombotique, biologique, secondaire). Les patients sont exclus si il y a une autre thrombophilie (déficit en protéine C, protéine S, AT, mutation Leiden du facteur V et mutation 20210A du gène de la prothrombine), si ils sont sous traitement anticoagulant. Les D dimères ont été dosés en parallèle pour évaluer l'activation de la coagulation.

Les prélèvements ont été faits sur tubes en PET (Venosafe Plastic tube, terumo, Japon) contenant 0,109M de citrate trisodique (1/10). Les plasmas ont été doublement centrifugés et congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

Une demande de non opposition est effectuée lors des consultations des patients pour nous autoriser à conserver du plasma pour d'éventuels travaux de recherche. Cette étude rétrospective se fait sur des patients SAPL venus entre le 1^{er} janvier 2012 et le 30 septembre 2015 en consultation

1.1.2. Recherche d'un Lupus anticoagulant

La mise en évidence d'un LA par le test PTT-LA (Diagnostica Stago, Asnières, France). Il s'agit d'un TCA sensibilisé à la présence d'un anticoagulant lupique.

Les tests de confirmation sont un DRVVT (DRVVT screen, Diagnostica Stago, Asnières, France) et un DRVVT de confirmation (DRVVT confirm, Diagnostica Stago, Asnières, France). La technique de confirmation contient une quantité plus importante de PL pour mettre en évidence la nature phospholipide dépendante de l'ACC.

1.1.3. Dosage des anti-β2GPI et ACL

Les anti-β2GPI IgM (EliA b2-Glycoprotein I IgM, Phadia, Thermo scientific, Villebon sur Yvette, France) et les anti-β2GPI IgG (EliA b2-Glycoprotein I IgM, Phadia, Thermo scientific, Villebon sur Yvette, France) ont été recherchés par méthode ELISA.

Les ACL IgM (QUANTA lite IgM ACA III, Inova, WERFEN, Le Pré saint Gervais, France) et ACL IgG (QUANTA lite IgG ACA III, Inova, WERFEN, Le Pré saint Gervais, France) ont été recherchés par méthode ELISA.

1.1.4. Test de génération de thrombine sur patients SAPL

Le TGT est effectué avec un Fluoroscan Ascent® fluorometer (Thermoscientific Labsystems, Helsinki, Finland) et les calculs sont effectués grâce au logiciel Thrombinoscope™ software (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands).

Pour chaque série de patients SAPL, le pool de plasmas témoins a servi de contrôle de qualité interne pour vérifier qu'il n'y avait aucune déviation entre les manipulations.

Le principe de préparation de la plaque est le suivant :

-20µl de mélange FT et PL (PPP low reagent, Diagnostica Stago, Asnières, France) ou 20µl de calibrant (Thrombin calibrator, Diagnostica Stago, Asnières, France)

- +/-10µl PCa a une concentration de 6,7 nM

-80µl de PPP de patient ou contrôle passé en duplicate

- distribution de 20µl de mélange fluorochrome+calcium pour commencer la réaction

1.2. Patients FPI

Les patients présentant une FPI avaient les caractéristiques cliniques suivant :

	Patients FPI (n=4)
Male (%)	3 (75.0)
Age – année-médiane [IQR]	75.4 [59.6-79.8]
BMI - kg/m ² , médiane [IQR]	21.9 [20.4-24.5]
Facteurs de risques cardiovasculaires	
Hypertension – n (%)	0 (0.0)
Dyslipidémie– n (%)	0 (0.0)
Diabète – n (%)	0 (0.0)
Insuffisance rénale chronique – n (%)	0 (0.0)
Fumeur– n (%)	2 (50.0)
Antécédents médicaux	
Cancer – n (%)	1 (25.0)
Syndrome coronarien aigu – n (%)	0 (0.0)
Fibrillation atrial– n (%)	0 (0.0)
AVC – n (%)	0 (0.0)
Thrombose veineuse profonde – n (%)	1 (25.0)

1.3. Patients COVID19

1.3.1 Inclusion de patients COVID19

Les patients présentant une infection à SARS-Cov-2 ont été admis dans une des unités « COVID+ » du CHU de Rouen. Dans les 24 heures suivant l'admission du patient, une note d'information a été donnée au patient pour l'informer de l'étude et recueillir sa non-opposition. Le patient sera suivi pendant toute la durée de son hospitalisation. Une autorisation du comité de protection de la personne (2020-A00914-35) et un numéro Clinicaltrials.gov identifier: NCT04367662

1.3.2. Descriptifs des données recueillies

L'ensemble des données de l'étude ont été recueillies à partir du dossier clinique des patients. Elles correspondaient à celles recueillies au cours de la prise en charge standard du patient.

- Données démographiques (Age, sexe, poids, taille)
- Données biologiques sur le bilan d'admission
- Antécédents médicaux et chirurgicaux
- Traitement pharmacologique à l'entrée et au cours d'hospitalisation
- Présence de comorbidités
- Présence d'antécédents thrombo-emboliques veineux ou de facteurs de risque de maladie thromboembolique veineuse
- Présence d'antécédents cardio-vasculaires ou de facteurs de risque cardiovasculaires
- Survenue d'un évènement thrombo-embolique
- Survenue d'un évènement infectieux
- Survenue d'une complication d'organe
- Survenue d'un décès

1.3.3. Marqueurs d'hypercoagulabilités étudiés

- D dimères
- Monomères de fibrine
- Fragments 1 et 2 de la prothrombine
- Antithrombine
- Test de génération de thrombine
- Facteur Willebrand, Facteur VIII

1.4. Pool témoin

Le pool de plasmas témoins est préparé dans l'Unité d'hémostase à partir de plasmas d'adulte de sexe masculin et féminin de tout âge. Le prélèvement se fait sur tubes en PET (Venosafe© Plastic tube, Geiner, Japon) contenant 0,109M de citrate trisodique (1/10). Les plasmas sont doublement centrifugés et congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

Un dosage de TP, TCA et fibrinogène a été effectué pour vérifier si les donneurs sains n'ont pas de déficit en facteur de la coagulation ou d'ACC.

ARTICLES ET DISCUSSION

Manuscrit numéro 1

Le premier travail de cette thèse a consisté en une revue de la littérature sur la thématique : Test de génération de thrombine et maladies auto-immunes. Les maladies auto-immunes sont régulièrement associées à une atteinte endothéliale, secondaire à un état proinflammatoire. Parmi les maladies auto-immunes étudiées par le TGT, le SAPL est celle qui a été le plus étudiée. La raison est l'existence d'une hypercoagulabilité, associée à des récives thrombotiques malgré les traitements anticoagulants. Il a été démontré, grâce au TGT, que les patients n'ont pas d'hypercoagulabilité (du fait du traitement anticoagulant) mais une RPCa . La présence d'une RPCa est associée à un risque de récive thrombotique.

Dans le LES, une RPCa est également retrouvée et l'activité de la maladie est corrélée aux paramètres du TGT (augmentation de l'ETP dans les maladies actives). La maladie de Behçet est une vascularite qui peut se compliquer d'évènement thromboembolique. Il n'existe pas de marqueur biologique d'activité de la maladie. Dans les 3 études effectuées sur TGT et maladie de Behçet, une retrouvait une corrélation entre les paramètres du thrombinogramme et l'activité de la maladie, et une autre retrouvait un état hypercoagulable chez les patients ayant un antécédent d'évènement thromboembolique.

Cette revue décrit des biais méthodologiques (absence de standardisation entre les techniques utilisées) et ouvre la voie à l'utilisation du TGT dans ces différentes maladies pour évaluer la réponse aux traitements des patients.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Carrefour des spécialités

Place du test de génération de thrombine dans les maladies auto-immunes

Thrombin generation assay in autoimmune disease

P. Billoir^{a,*}, V. Le Cam Duchez^a, S. Miranda^b, V. Richard^c, Y. Benhamou^b

^a Inserm U1096, Vascular Hemostasis Unit, Rouen University Hospital, Normandie University, UNIROUEN, 76000 Rouen, France

^b Inserm U1096, Department of Internal Medicine, Rouen University Hospital, Normandie University, UNIROUEN, Rouen, France

^c Inserm U1096, Department of Pharmacology, FHU REMOD-VHF, Rouen University Hospital, Normandie University, UNIROUEN, 76000 Rouen, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le xxx

Mots clés :
Test de génération de thrombine
Maladie auto-immune
Hypercoagulabilité

Keywords:
Thrombin generation assay
Auto immune disease
Hypercoagulability

RÉSUMÉ

Le test de génération de thrombine (TGT) évalue l'initiation, la propagation et l'inhibition de la coagulation. Ce test global permet d'évaluer le risque hémorragique chez les patients hémophiles, mais il peut aussi être utilisé pour étudier les états hypercoagulables. L'intérêt de ce test serait de dépister le risque cardiovasculaire, régulièrement associé aux maladies auto-immunes (MAI). Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) a été étudié par cette technique pour prédire le risque thrombotique des patients. Dans les autres maladies auto-immunes sans événement thrombotique, le TGT est retrouvé augmenté, principalement dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), le lupus érythémateux systémique et la maladie de Behçet. Ces résultats dans la PR sont corrélés avec l'activité inflammatoire de la maladie. Dans le lupus érythémateux systémique et la maladie de Behçet, le TGT semble être le reflet de l'activité de la maladie. En conclusion, le TGT reste relativement peu utilisé dans l'évaluation clinique des MAI, mais son rôle futur dans le choix de certains traitements potentiellement thrombogènes pourrait devenir important. Enfin, le lien franc entre coagulation et inflammation, synonyme de maladie active, peut être appréhendé par l'utilisation du TGT avec encore certaines limites d'interprétation principalement liées à l'absence de standardisation.

© 2021 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

SUMMARY

Thrombin generation assay (TGA) is a useful tool to evaluate the initiation, propagation and inhibition of coagulation. TGA is a global test that is used to assess hemorrhagic risk in hemophilia patients, but it can also be used to study hypercoagulable states. The interest of TGA is to screen for cardiovascular risk, which is regularly associated with autoimmune disease (AID) such as antiphospholipid syndrome. Indeed, TGA has been used to evaluate hypercoagulability in patients with antiphospholipid syndrome treated with rivaroxaban versus warfarin. In other AIDs without thrombotic events, TGA measurement is elevated, mainly in rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus and Behçet's disease. These findings in RA are correlated with the inflammatory activity of the disease. In systemic lupus erythematosus and Behçet's disease, TGA appears to reflect disease activity. In conclusion, TGA remains relatively under used in the clinical evaluation of AID, but it could play a greater role in the evaluation of certain potentially thrombogenic treatments in AID. Finally, TGA helps measuring AID activity, due to the clearlink between coagulation and inflammation, despite some limitations of interpretation mainly due to a lack of standardization.

© 2021 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : paul.billoir@chu-rouen.fr (P. Billoir).

<https://doi.org/10.1016/j.revmed.2021.06.006>

0248-8663/© 2021 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

1. Introduction

Les lésions tissulaires ou infectieuses induisent une activation coordonnée de l'inflammation et de l'hémostase [1]. La thrombose est une réponse hémostatique exagérée à ces mécanismes de défense. Un nombre croissant de données indique que certaines maladies auto-immunes (MAI), telles que le lupus érythémateux systémique (LES) et la polyarthrite rhumatoïde (PR), sont régulées par des composants du système hémostatique [2]. Par ailleurs, des événements thrombotiques peuvent être associées à ces MAI [3]. La thrombine est une enzyme clé de la coagulation. La thrombine peut cliver de nombreux substrats qui ont des fonctions procoagulantes (activation des facteurs de la coagulation et des plaquettes, inactivation d'A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats 13 [ADAMTS 13]) et anticoagulantes (protéine C activée) [4]. Elle a des propriétés pro-inflammatoires, par l'activation de *protease activated receptor 1* et 4 [5], et active le complément [6]. Le test de génération de thrombine (TGT) est utilisé pour évaluer le risque hémorragique chez les hémophiles [7,8], mais peut aussi être utilisé pour évaluer le risque thrombotique [9-11] et le risque de récurrence thrombotique [12-16]. Nous proposons ici une mise au point sur l'utilisation du TGT dans les MAI.

2. La mesure de la génération de thrombine

Le TGT est une technique fonctionnelle qui permet d'évaluer globalement les trois phases de la coagulation qui se succèdent (Fig. 1) [17]:

- l'initiation qui correspond aux premières traces de thrombine générée ;
- la propagation avec le phénomène d'auto-amplification de la formation de thrombine ;
- l'inhibition avec l'action de l'antithrombine et l'activation de la protéine C en protéine C activée.

Les résultats sont exprimés sous forme de courbe (Fig. 2). Les différents paramètres mesurés sont le « *lagtime* » (premières traces de thrombine formée, correspondant à un taux de prothrombine ou au temps de céphaline plus activateur), le temps de formation du pic et le pic maximal de thrombine, la quantité totale de thrombine formée (*endogenous thrombin potential* [ETP]) et la vitesse de formation de thrombine (vélocité). Cette méthode dynamique a pour avantage de refléter globalement la cascade de la coagulation *ex vivo*. Pour affiner l'évaluation de la coagulation, l'ajout de thrombomoduline ou de protéine C activée permet d'étudier la résistance à la protéine C activée [18,19]. En effet, la présence de thrombomoduline, non présente au niveau plasmatique, est indispensable pour étudier l'activation de la protéine C et son action inhibitrice sur la coagulation. D'autres marqueurs, mesurés de manière statique, peuvent être mis en défaut par un processus pathologique associé, comme les fragments 1+2 de la prothrombine (F1+2), polypeptides libérés lors de la formation de thrombine, ou les D-dimères, très sensibles mais peu spécifiques [20]. Dans la maladie thromboembolique, outre les D-dimères, il a été démontré que l'élévation des F1+2 étaient corrélées à la récurrence thrombotique après arrêt du traitement anticoagulant et sont utiles lors de l'évaluation du risque thrombotique au cours de la grossesse [21]. De plus, les D-dimères participent à la prédiction de récurrences thrombotiques grâce au score HERDOO2 chez la femme [22].

Le TGT souffre cependant d'un défaut de standardisation entre les études. L'*International Society of Thrombosis and Hemostasis* (ISTH) a proposé un protocole standardisé et des recommandations pour la réalisation du TGT dans les maladies hémorragiques [23], mais pas dans les états d'hypercoagulabilité. Dargaud et al. ont

évalué la standardisation de ce test grâce à un échantillon de plasma témoin [24,25]. La conclusion de ces études était qu'un plasma témoin pouvait être utilisé pour standardiser et normaliser le test et ainsi diminuer la variabilité intercentre [26]. Actuellement, le TGT est utilisé dans la pratique clinique pour évaluer le risque hémorragique chez les hémophiles, et la substitution par les traitements anti-hémophiliques [7]. Il est utilisé dans le domaine de la recherche pour évaluer le risque thrombotique [10,27], et le risque de récurrence thrombotique [12-16]. Le Tableau 1 reprend les différentes études du TGT dans les MAI.

3. TGT et syndrome des antiphospholipides

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) est un syndrome clinicobiologique associant la persistance d'anticorps antiphospholipides (aPL) et un événement vasculaire de type thrombotique et/ou une morbidité obstétricale [28]. La physiopathologie du SAPL suit la théorie du « *two hit trigger* », c'est-à-dire la présence d'anticorps antiphospholipides et une agression aigüe (infection, cancer, etc.) provoquent une dysfonction endothéliale. Notre équipe a montré que, secondairement, l'atteinte endothéliale induit un état d'hypercoagulabilité [29] et une résistance à la protéine C activée (RPCa), démontrée au niveau cellulaire [30] et au niveau plasmatique par TGT [31]. Cette RPCa est retrouvée chez les patients porteurs d'un SAPL thrombotique avec persistance d'un anticoagulant circulant en comparaison à des patients porteurs sains d'un anticoagulant circulant sans événement clinique [32]. Dans une étude comparant 50 patients SAPL sous anticoagulant et 50 patients anticoagulés pour thrombose veineuse profonde sans SAPL, la seule différence observée était une augmentation du *lagtime* (induit par les aPL) sans modification de l'ETP, lorsque le traitement par anti-vitamine K (AVK) était dans la cible thérapeutique.

L'étude RAPS (*Rivaroxaban in Antiphospholipid Syndrome*) [33] évaluait la possibilité de traiter les patients atteints de SAPL avec un anticoagulant oral direct en comparaison au traitement de référence que sont les AVK. Le critère de jugement principal reposait sur le TGT. La comparaison de différents marqueurs d'hypercoagulabilité entre le groupe traité par rivaroxaban et le groupe traité par warfarine a montré un ETP plus élevé (1086 nM.min contre 548 nM.min) et des F1+2 plus élevés (93,6 nM contre 45,6 nM). En revanche, dans le groupe rivaroxaban, le pic de thrombine était plus faible (55,6 nM contre 85,7 nM). La différence observée entre les deux stratégies est principalement attribuée au mécanisme d'action des deux traitements. Les AVK diminuent la synthèse de prothrombine et, par conséquent, la thrombine formée, expliquant un ETP plus faible, alors que le rivaroxaban inhibe le facteur X activé. Le traitement par rivaroxaban dans le SAPL n'empêche pas la formation de thrombine, directement quantifiée par l'augmentation des F1+2, ainsi que l'amplification de thrombine formée, démontrée par une augmentation de thrombine formée (ETP augmenté).

Par ailleurs, deux études se sont intéressées à la prédiction de la survenue d'une thrombose au cours du SAPL. La première a montré que le TGT n'était pas optimal pour prédire la survenue d'une thrombose : l'association d'une persistance d'aPL et d'une RPCa avait une sensibilité de 0,72 et une spécificité de 0,62 comme marqueurs prédictifs. Les critères cliniques étaient plus spécifiques (hypertension, thrombose artérielle) [34]. La seconde étude montre une corrélation forte entre le risque de récurrence thrombotique, la présence d'antidomaine I de la β_2 -glycoprotéine I et une RPCa mesurée par le TGT (*Hazard Ratio* (HR), 3,90 [intervalle de confiance à 95% (IC 95%), 1,33-11,46], $p=0,01$; HR, 4,98 [IC 95%, 1,36-18,28], $p=0,02$ respectivement) [35].

Une thérapeutique potentielle du SAPL serait l'utilisation d'hydroxychloroquine [30]. Dans un modèle translationnel de

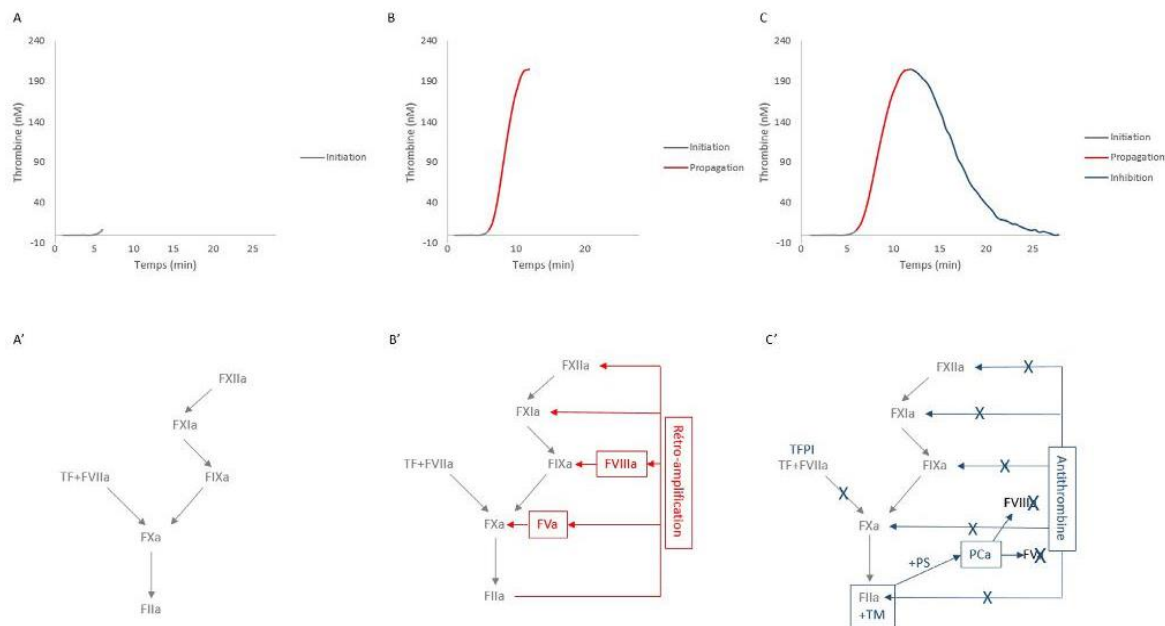


Fig. 1. Parallèle entre la génération de thrombine (A-C) et la cascade la coagulation (A', B', C'). La phase d'initiation correspond à l'activation de la voie endogène et exogène (A et A'). La propagation correspond à l'amplification de la thrombine formée, avec activation des cofacteurs V et VIII, et des facteur IX, X et XI par la thrombine (B et B'). L'inhibition correspond à l'inactivation de la génération de thrombine par 3 inhibiteurs (antithrombine, protéine C activé, *Tissue factor pathway inhibitor*) (C et C') : FIIa : thrombine ; FVa : facteur V activé ; FVIIIa : facteur VIII activé ; FVIIIa : facteur VIII activé ; FIXa : facteur IX activé ; FXa : facteur X activé ; FXIa : facteur XI activé ; FXII : Facteur XII activé ; PCa : protéine C activée ; PS : protéine S ; TF : facteur tissulaire ; TFPI : *Tissue factor pathway inhibitor* ; TM : thrombomoduline.

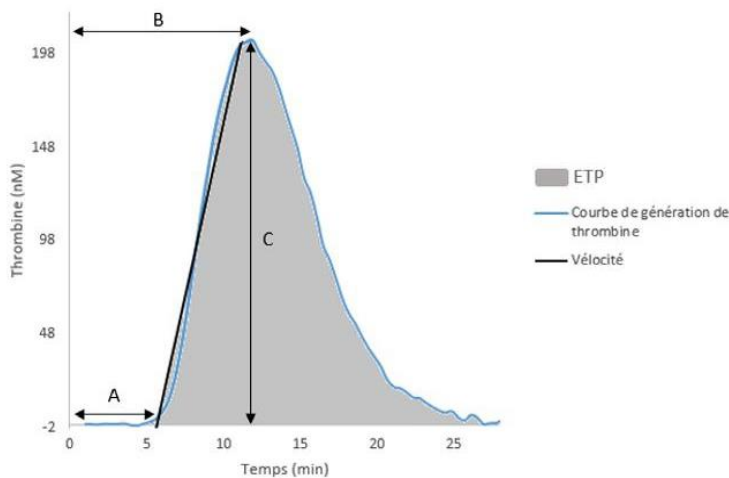


Fig. 2. Profil d'une courbe de génération de thrombine. A. Le lagtime qui correspond au première trace de thrombine formée. B. Le temps au pic qui correspond au temps nécessaire à atteindre le maximum de thrombine formée. C. Le pic maximal de thrombine formée. L'ETP correspond à l'air sous la courbe (la totalité de thrombine formée). En bleu, le tracé d'une courbe de génération de thrombine. En noir, la vitesse de formation de thrombine.

SAPL, sur modèle cellulaire et murins, notre équipe a montré que l'hydroxychloroquine diminuait le potentiel thrombogène des aPL par l'intermédiaire d'une modification de la RPCa, en normalisant l'expression de la thrombomoduline et de l'*endothelial protein C receptor* [30]. D'autres modèles cellulaires d'hypercoagulabilité ont été évalués par le TGT, ce qui permet une étude potentielle de nouvelles thérapeutiques [36].

4. TGT et lupus érythémateux systémique

L'activation de la coagulation a été décrite dans le LES. Des D-dimères élevés ont été décrits comme étant associés à la sérite

lupique [37]. Une étude des mêmes auteurs a aussi décrit une association entre D-dimères et activité de la maladie [38]. Ils nécessitaient cependant d'être associés à la mesure de la fraction C4 du complément pour un meilleur pouvoir discriminatoire. Le TGT a été étudié dans quelques travaux qui se sont intéressés à l'état d'hypercoagulabilité au cours du LES. Une première étude a démontré une augmentation de la génération de thrombine associée à une hypercoagulabilité et à la présence de phospholipides plaquettaires [39]. Cette augmentation n'était pas corrélée à l'activité de la maladie. Certains auteurs ont démontré la présence d'une RPCa dans le LES [40]. Dans cette étude, seule la RPCa était mise en évidence comme marqueur d'hypercoagulabilité, les D-dimères étaient

Tableau 1
Résumé de l'utilisation du test de génération de thrombine dans les maladies auto-immunes.

Référence	Maladie auto-immune	Nombre de patients	Résultats	Commentaire
Regnault, 2003 [29]	SAPL	8	Lagtime et RPCa augmenté	Étude sur PPP et PRP RPCa associé à un antécédent thrombotique
Liestol, 2007 [30]	SAPL	81	RPCa augmentée	
Cohen, 2016 [31]	SAPL	54 traités par rivaroxaban 56 traités par warfarine	ETP augmenté chez les patients traités par rivaroxaban	Les critères cliniques étaient plus spécifiques pour prédire la récurrence thrombotique La présence d'antidomaine I de la β_2 -GP I est associée à un risque de récurrence (HR, 3,90 [IC 95 %, 1,31–10,31])
Zuily, 2013 [32]	SAPL LES	92	Persistance d'aPL et d'une RPCa associé à un risque de récurrence thrombotique (HR, 3,67 [IC 95 %, 1,31–10,31])	
Zuily, 2020 [33]	SAPL	137	RPCa associée à un risque de récurrence thrombotique (HR, 3,90 [HR, 4,98 [IC95 %, 1,36–18,28]])	
Pereira, 2007 [37]	LES	30	ETP augmenté chez les patients LES par rapport au groupe témoin, sans corrélation avec l'activité de la maladie	TGT réalisé sur phospholipides plasmatiques
Meesters, 2007 [38]	LES	25	RPCa augmenté par rapport au groupe témoin	
Kern, 2017 [39]	LES	22	ETP diminué chez les LES par rapport à un groupe témoin	TGT corrélé à l'activité de la maladie Absence de corrélation avec l'activité de la maladie
Cicarini, 2020 [40]	LES	30 LES SLEDAI-2K \leq 4 30 LES SLEDAI-2K $>$ 4	ETP augmenté dans le groupe SLEDAI-2K $>$ 4 par rapport au groupe SLEDAI-2K \leq 4	
Vranic, 2019 [44]	PR	11 PR non ménopausés 31 PR ménopausés	Pas de différence entre les deux groupes	
Kern, 2016 [46]	PR	25	ETP, le lagtime et le time to peak étaient diminués, la vélocité était augmentée par rapport à un groupe témoin	TGT corrélé à l'activité de la maladie Absence de corrélation avec l'activité de la maladie
Undas, 2010 [47]	PR	46	ETP, le pic et la vélocité étaient augmentés	
Fernandez-Bello, 2013 [49]	Behçet	23	ETP et la vélocité étaient augmentés par rapport au groupe témoin	TGT augmenté dans le groupe maladie active
Le Joncour, 2019 [50]	Behçet	73 patients 28 avec maladie active 45 avec une maladie inactive		
Mejia, 2014 [51]	Behçet	56 patients 17 avec un antécédent thrombotique	ETP augmenté dans le groupe avec antécédent de thrombose par rapport au groupe sans antécédent thrombotique	Pas de corrélation avec l'activité de la maladie ou le traitement Pas de différence entre les répondeurs et non répondeurs
Hilhorst, 2013 [52]	Vascularite à ANCA	31	ETP augmenté chez les patients en rémission par rapport à un groupe témoin	
Mastalerz, 2015 [53]	CEPA	34	Pic de thrombine augmentée par rapport au groupe témoin	Pas de différence entre les deux groupes
Yoshizawa, 2019 [54]	Kawasaki	42	ETP augmenté avant traitement par IgIV et diminué 4 semaines après traitement	
Garabet, 2019 [57]	PTI	26 avant traitement par agoniste du TPO 18 traités depuis 1 an par agoniste du TPO	Pas de différence entre les deux groupes	

Abréviations : IC 95% : intervalle de confiance à 95 % ; ETP : endogenous thrombin potential ; GPE : granulomatose éosinophilique avec polyangéite ; IgIV : immunoglobuline polyvalente ; LES : lupus érythémateux systémique ; PPP : plasma pauvre en plaquette ; PR : polyarthrite rhumatoïde ; PRP : plasma riche en plaquettes ; PTI : purpura thrombopénique immunologique ; RPCa : résistance à la protéine C activé ; SAPL : syndrome des antiphospholipides ; TPO : thrombopoïétine.

augmentés de façon non significative et les F1 + 2 étaient diminués comparativement au groupe témoin. Il faut noter que la RPCa n'était pas associée à un SAPL secondaire.

Par ailleurs, le TGT a été évalué comme marqueur éventuel d'activité de la maladie. Une première étude, portant sur 22 patients avec un score SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) médian de 6 [3,5–8], a retrouvé un ETP diminué dans le groupe LES comparé au groupe témoin, alors que les autres paramètres du TGT étaient similaires. [41]. La seconde étude a inclus 60 patients et a séparé les patients à faible activité de maladie (SLEDAI \leq 4, $n = 30$) et ceux à activité modérée (SLEDAI $>$ 4, $n = 30$). Dans cette étude, les différents paramètres du TGT étaient augmentés dans les 2 groupes comparativement au groupe témoin. De même, l'ETP était augmenté dans le groupe à activité modérée comparativement au groupe à faible activité de LES [42]. Les D-dimères étaient

aussi augmentés dans le groupe SLEDAI $>$ 4, mais sans corrélation franche avec l'activité de la maladie. La différence de résultats entre les 2 études découle des critères d'inclusion des patients et de la méthodologie utilisée pour effectuer le TGT : la seconde étude utilisait une concentration plus faible de facteur tissulaire, plus adaptée à l'évaluation globale de la coagulation et à l'atteinte vasculaire [43].

5. TGT et polyarthrite rhumatoïde

Au cours de la polyarthrite rhumatoïde (PR), le risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaire a été largement étudié [44]. Dans cette maladie en phase inflammatoire, les marqueurs d'activation de la coagulation (D-dimères, F1 + 2) sont associés à l'inflammation et diminuent après une prise en charge thérapeutique [45]. Une étude s'est intéressée à l'impact de la ménopause

sur la génération de thrombine dans la PR. Cette étude a comparé 14 patientes témoins, 34 patientes témoins ménopausées, 11 patientes avec une PR non ménopausées et 31 patientes ménopausées avec une PR. La seule différence observée était un ETP plus faible dans le groupe témoin des femmes non ménopausées par rapport aux autres groupes [46]. La différence observée entre les femmes non ménopausées et ménopausées était secondaire à une diminution de taux d'œstrogènes, associé à l'apparition d'un risque cardiovasculaire chez les femmes [47].

Deux autres études se sont intéressées au TGT comme marqueur éventuel de l'activité de la maladie. Dans la première étude, l'ETP, le « *lagtime* » et le « *time to peak* » étaient diminués, la vélocité était, quant à elle, augmentée [48]. Dans la seconde étude, les résultats étaient contradictoires [49] : l'ETP, le pic et la vélocité étaient augmentés, le « *lagtime* » et le « *time to peak* » étaient par contre allongés. Les marqueurs du TGT étaient corrélés au DAS 28 (*Disease Activity Score 28*). Par ailleurs, cette corrélation n'était pas dépendante de l'ancienneté de la maladie, de l'âge ou du taux protéine C-réactive (CRP), mais dépendante de l'augmentation du facteur VIII et du *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI). Le facteur VIII et le TFPI sont des protéines qui augmentent lors de l'inflammation, ce qui peut expliquer leur impact sur le TGT chez les patients avec une maladie active. Il est à noter qu'aucune étude ne s'est intéressée à l'impact du traitement de la PR sur l'hypercoagulabilité.

6. TGT et vascularites

La maladie de Behçet est une maladie inflammatoire systémique rare, avec une atteinte endothéliale et une thrombogénicité associée [50]. Deux études contradictoires se sont intéressées au lien entre l'activité de la maladie et le TGT. Dans la première, l'ETP et la vélocité étaient augmentés dans le groupe maladie de Behçet en comparaison au groupe témoin, mais sans corrélation avec l'activité de la maladie [51]. Les D-dimères n'étaient pas différents entre les 2 groupes. Dans la seconde étude, les auteurs se sont intéressés à la comparaison de génération de thrombine entre maladie de Behçet active et inactive. La génération de thrombine était augmentée dans le groupe maladie active et dépendait de la nérose [52]. Cette différence entre les deux études peut s'expliquer par la différence entre les groupes de patients étudiés. Dans la première, il s'agissait de patients avec une maladie active comparés à des sujets témoins sains, alors que dans la seconde, tous les sujets étaient des patients et la comparaison était entre maladie active et inactive. D'autres auteurs se sont intéressés à la maladie de Behçet sous traitement anticoagulant pour thrombose [53]. Les malades souffrant de maladie de Behçet avec un antécédent de thrombose avaient un ETP augmenté comparativement à ceux sans antécédent thrombotique. Sous traitement par AVK, les patients avaient une génération de thrombine équivalente à celle de patients sous AVK pour fibrillation auriculaire donc sans contexte d'hypercoagulabilité.

Dans les vascularites à ANCA, il a été démontré une persistance de l'augmentation de l'ETP après le diagnostic, quel que soit le traitement utilisé (corticoïde, azathioprine, méthotrexate) [54]. Dans cette étude, les D-dimères n'étaient pas différents entre le groupe vascularite et le groupe témoin sains.

Dans la granulomatose éosinophilique avec polyangéite, le TGT et la formation du caillot de fibrine ont été étudiés. Une augmentation du pic de thrombine a été retrouvée ; elle était corrélée à un défaut de fibrinolyse chez les patients en comparaison au groupe de témoins sains, sans être corrélée à l'activité de la maladie ou au traitement des patients [55].

Dans la maladie de Kawasaki, une étude a montré une augmentation de l'ETP avant traitement et une diminution à 4 semaines après des perfusions d'immunoglobulines polyvalentes [56]. Néanmoins, la diminution ne permettait pas de retrouver un état de

coagulabilité normal. Il n'y avait cependant pas de différence entre les sujets répondeurs et non répondeurs.

7. TGT et thrombopénie immunologique

La thrombopénie immunologique peut être associée à des événements thrombotiques [57]. Des auteurs ont montré une augmentation de génération de thrombine chez des patients atteints de thrombopénie immunologique. Cette augmentation était secondaire à une RPCa. Il faut noter que tous les patients de cette étude avaient été traités par corticoïdes, ce qui a pour effet d'augmenter les facteurs de la coagulation et par conséquent le TGT [58]. L'utilisation d'agonistes de la thrombopoïétine ne modifient pas le TGT [59].

8. Conclusion

Comme précédemment décrit dans les états hypercoagulables [60], le TGT est une méthode fonctionnelle pour évaluer globalement la coagulation. Il a été utilisé dans peu d'études, avec un nombre limité de patients, ce qui occasionne une imprécision de mesure, un manque de confirmation par d'autres études et par conséquent des difficultés de transposabilité à une situation clinique de routine pour valider une utilisation pratique du TGT. Il a beaucoup été utilisé dans le SAPL, avec le versant thrombotique associé. Il reste relativement peu utilisé dans l'évaluation clinique des autres MAI, mais son rôle futur dans le choix de certains traitements potentiellement thrombogènes pourrait devenir important. Ce test pourrait aussi être utilisé pour évaluer la réponse aux traitements immunosuppresseurs et immunomodulateurs. Enfin, le lien franc entre coagulation et inflammation, synonyme de maladie active, peut être appréhendé par l'utilisation du TGT avec encore certaines limites d'interprétation principalement liées à l'absence de standardisation. Cet automate relève à ce jour d'un centre spécialisé, mais avec l'évolution technologique (ST Genesia®), il sera prochainement possible de réaliser le TGT comme un test de routine d'hémostase.

Contributions des auteurs

P. Billoire a analysé et interprété les données, réalisé les figures et rédigé le manuscrit. V. Le Cam Duchez a analysé et interprété les données et a rédigé le manuscrit. S. Miranda a interprété les données et relu de manière critique le manuscrit. V. Richard et Y. Benhamou ont relu le manuscrit de manière critique. Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale du manuscrit.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood* 2019;133:906–18.
- [2] Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:534–42.
- [3] Borjas-Howard JF, Leeuw de K, Rutgers A, Meijer K, Tichelaar VYIG. Risk of recurrent venous thromboembolism in autoimmune diseases: a systematic review of the literature. *Semin Thromb Hemost* 2019;45:141–9.
- [4] Huntington JA. Molecular recognition mechanisms of thrombin. *J Thromb Haemost* 2005;3:1861–72.
- [5] Adams MN, Ramachandran R, Yau M-K, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther* 2011;130:248–82.
- [6] Krisinger MJ, Goebeler V, Lu Z, Meixner SC, Myles T, Prydzial ELG, et al. Thrombin generates previously unidentified C5 products that support the terminal complement activation pathway. *Blood* 2012;120:1717–25.

- [7] Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C. Global haemostasis and point of care testing. *Haemoph* 2012;18(Suppl 4):81–8.
- [8] Billoir P, Feugray G, Chrétien MH, Duchez VLC. Thrombin generation assay is a useful pre-operative tool to predict non-bleeding risk in a patient with mild factor V deficiency. *Transfus Med Oxf Engl* 2020;30:408–9.
- [9] Billoir P, Duflo T, Fresel M, Chrétien MH, Barbay V, Le Cam Duchez V. Thrombin generation profile in non-thrombotic factor V Leiden carriers. *J Thromb Thrombolysis* 2019;47:473–7.
- [10] Wielders S, Mukherjee M, Michiels J, Rijkers DT, Cambus JP, Knebel RW, et al. The routine determination of the endogenous thrombin potential, first results in different forms of hyper- and hypocoagulability. *Thromb Haemost* 1997;77:629–36.
- [11] Billoir P, Alexandre K, Duflo T, Roger M, Miranda S, Gorla O, et al. Investigation of coagulation biomarkers to assess clinical deterioration in SARS-CoV-2 infection. *Front Med* 2021;8.
- [12] Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA* 2006;296:397–402.
- [13] Besser M, Baglin C, Luddington R, van Hylckama Vlieg A, Baglin T. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *J Thromb Haemost JTH* 2008;6:1720–5.
- [14] Chairati R, Jennersjö C, Lindahl TL. Is thrombin generation at the time of an acute thromboembolic episode a predictor of recurrence? The Linköping Study on Thrombosis (JUST) – a 7-year follow-up. *Thromb Res* 2013;131:135–9.
- [15] van Hylckama Vlieg A, Christiansen SC, Luddington R, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Baglin TP. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *Br J Haematol* 2007;138:769–74.
- [16] van Hylckama Vlieg A, Baglin CA, Luddington R, MacDonald S, Rosendaal FR, Baglin TP. The risk of a first and a recurrent venous thrombosis associated with an elevated D-dimer level and an elevated thrombin potential: results of the THE-VTE study. *J Thromb Haemost JTH* 2015;13:1642–52.
- [17] Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006;96:553–61.
- [18] Wada H, Sakakura M, Kushiya F, Nisikawa M, Onishi K, Nakatani K, et al. Thrombomodulin accelerates activated protein C production and inhibits thrombin generation in the plasma of disseminated intravascular coagulation patients. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb* 2005;16:17–24.
- [19] Nicolaes GA, Thomassen MC, Tans G, Rosing J, Hemker HC. Effect of activated protein C on thrombin generation and on the thrombin potential in plasma of normal and APC-resistant individuals. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb* 1997;8:28–38.
- [20] Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: what have we learned? *Blood Rev* 2012;26:197–203.
- [21] Poli D, Antonucci E, Ciuti G, Abbate R, Prisco D. Combination of D-dimer, F1+2 and residual vein obstruction as predictors of VTE recurrence in patients with first VTE episode after OAT withdrawal. *J Thromb Haemost JTH* 2008;6:708–10.
- [22] Raj L, Presles E, Le Mao R, Robin P, Sanchez O, Pernod G, et al. Evaluation of venous thromboembolism recurrence scores in an unprovoked pulmonary embolism population: a post-hoc analysis of the PADIS-PE trial. *Am J Med* 2020;133:e406–21.
- [23] Dargaud Y, Wolberg AS, Gray E, Negrier C, Hemker HC, Subcommittee on Factor VIII, Factor IX. Rare coagulation disorders. Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost JTH* 2017;15:1704–7.
- [24] Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Lecompte T, Siegemund T, Baglin T, et al. Standardisation of thrombin generation test—which reference plasma for TGT? An international multicentre study. *Thromb Res* 2010;125:353–6.
- [25] Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Negrier C, Lecompte T, Petros S, et al. Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study. *Br J Haematol* 2007;139:303–9.
- [26] Perrin J, Depasse F, Lecompte T, French-speaking CAT group and under the aegis of GEHT, French-speaking CAT group (all in France unless otherwise stated): French-speaking CAT group all in France unless otherwise stated. Large external quality assessment survey on thrombin generation with CAT: further evidence for the usefulness of normalisation with an external reference plasma. *Thromb Res* 2015;136:125–30.
- [27] Billoir P, Duflo T, Fresel M, Chrétien MH, Barbay V, Le Cam Duchez V. Thrombin generation profile in non-thrombotic factor V Leiden carriers. *J Thromb Thrombolysis* 2019.
- [28] Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost JTH* 2006;4:295–306.
- [29] Billoir P, Miranda S, Damian L, Richard V, Benhamou Y, Duchez VLC. Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2018;169:87–92.
- [30] Miranda S, Billoir P, Damian L, Thiebaut PA, Schapman D, Le Besnerais M, et al. Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. *PLoS One* 2019;14:e0212614.
- [31] Regnault V, Béguin S, Wahl D, de Maistre E, Coenraad Hemker H, Lecompte T. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 2003;89:208–12.
- [32] Liestl S, Sandset PM, Mowinckel M-C, Wisløff F. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost JTH* 2007;5:2204–10.
- [33] Cohen H, Hunt BJ, Efthymiou M, Arachchillage DR, Mackie IJ, Clawson S, et al. Rivaroxaban versus warfarin to treat patients with thrombotic antiphospholipid syndrome, with or without systemic lupus erythematosus (RAP5): a randomised, controlled, open-label, phase 2/3, non-inferiority trial. *Lancet Haematol* 2016;3:e426–36.
- [34] Zuily S, Regnault V, Guillemin F, Kaminsky P, Rat A-C, Lecompte T, et al. Superficial vein thrombosis, thrombin generation and activated protein C resistance as predictors of thromboembolic events in lupus and antiphospholipid patients. A prospective cohort study. *Thromb Res* 2013;132:e1–7.
- [35] Zuily S, de Laat B, Guillemin F, Kelchtermans H, Magy-Bertrand N, Desmurs-Clavel H, et al. Antidomain Iβ2-glycoprotein I antibodies and activated protein C resistance predict thrombosis in antiphospholipid syndrome: TAC(I)T study. *J Appl Lab Med* 2020.
- [36] Billoir P, Blandinières A, Gendron N, Chocron R, Gunther S, Philippe A, et al. Endothelial colony-forming cells from idiopathic pulmonary fibrosis patients have a high procoagulant potential. *Stem Cell Rev* 2020.
- [37] Liang Y, Leng R-X, Pan H-F, Ye D-Q. The prevalence and risk factors for serositis in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Rheumatol Int* 2017;37:305–11.
- [38] Liang Y, Xie S-B, Wu C-H, Hu Y, Zhang Q, Li S, et al. Coagulation cascade and complement system in systemic lupus erythematosus. *Oncotarget* 2018;9:14862–81.
- [39] Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost* 2006;95:94–9.
- [40] Meesters EW, Hansen H, Spronk HMH, Hamulyak K, Rosing J, Rowshani AT, et al. The inflammation and coagulation cross-talk in patients with systemic lupus erythematosus. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb* 2007;18:21–8.
- [41] Kern A, Barabás E, Balog A, Burcsár S, Kiszalák M, Vásárhelyi B. Characterization of the thrombin generation profile in systemic lupus erythematosus. *Physiol Int* 2017;104:35–41.
- [42] Cicarini WB, Duarte RCF, Ferreira KS, Loures C, de MG, Consoli RV, et al. Impact of markers of endothelial injury and hypercoagulability on systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2020;29:182–90.
- [43] Berntorp E, Salvagno GL. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:670–82.
- [44] Hansildaar R, Vedder D, Baniaamam M, Tausche A-K, Gerritsen M, Nurmohamed MT. Cardiovascular risk in inflammatory arthritis: rheumatoid arthritis and gout. *Lancet Rheumatol* 2020;3:e58–70.
- [45] Gualtierotti R, Ingegnoli F, Griffini S, Grovetti E, Meroni PL, Cugno M. Prothrombotic biomarkers in patients with rheumatoid arthritis: the beneficial effect of IL-6 receptor blockade. *Clin Exp Rheumatol* 2016;34:451–8.
- [46] Vranic A, Pruner I, Veselinovic M, Soutari N, Petkovic A, Jakovljevic V, et al. Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2019;38:3005–14.
- [47] Renda G, Patti G, Lang IM, Siller-Matula JM, Hylek EM, Ambrosio G, et al. Thrombotic and hemorrhagic burden in women: Gender-related issues in the response to antithrombotic therapies. *Int J Cardiol* 2019;286:198–207.
- [48] Kern A, Balog A, Dulic S, Barabás E, Kiszalák M, Vásárhelyi B. Alterations of the thrombin generation profile in rheumatoid arthritis. *J Thromb Thrombolysis* 2016;41:359–64.
- [49] Undas A, Gissel M, Kwasny-Krochin B, Glusko P, Mann KG, Brummel-Ziedins KE. Thrombin generation in rheumatoid arthritis: dependence on plasma factor composition. *Thromb Haemost* 2010;104:224–30.
- [50] Butta NV, Fernández-Bello I, López-Longo FJ, Jiménez-Yuste V. Endothelial dysfunction and altered coagulation as mediators of thromboembolism in Behçet disease. *Semin Thromb Hemost* 2015;41:621–8.
- [51] Fernández-Bello I, López-Longo FJ, Arias-Salgado EG, Jiménez-Yuste V, Butta NV. Behçet's disease: new insight into the relationship between procoagulant state, endothelial activation/damage and disease activity. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:81.
- [52] Le Joncour A, Martos R, Loyau S, Lelay N, Dossier A, Cazes A, et al. Critical role of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with Behçet's disease. *Ann Rheum Dis* 2019;78:1274–82.
- [53] Mejía J-C, Espinosa G, Tássies D, Reverter J-C, Cervera R. Endogenous thrombin potential in Behçet's disease: relationship with thrombosis and anticoagulant therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2014;32:S67–71.
- [54] Hilhorst M, Winckers K, Wilde B, van Oerle R, ten Cate H, Tervaert JWC. Patients with antineutrophil cytoplasmic antibodies associated vasculitis in remission are hypercoagulable. *J Rheumatol* 2013;40:2042–6.
- [55] Mastalerz L, Celińska-Lowenhoff M, Krawiec P, Batko B, Tlustochowicz W, Undas A. Unfavorably altered fibrin clot properties in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg–Strauss syndrome): association with thrombin generation and eosinophilia. *PLoS One* 2015;10:e0142167.
- [56] Yoshizawa H, Nogami K, Matsumoto T, Tsujii N, Sakai T, Takase T, et al. Dynamic evaluation of hemostasis in the acute phase of Kawasaki disease using comprehensive coagulation functional assays. *Thromb Res* 2019;174:76–83.

- [57] Ito S, Fujiwara S-I, Ikeda T, Toda Y, Mashima K, Umino K, et al. Evaluation of thrombotic events in patients with immune thrombocytopenia. *Ann Hematol* 2020;99:49-55.
- [58] Carrette M, Feugray G, Chamouni P, Le Cam Duchez V, Fretigny M, Barbay V, et al. Prednisolone treatment induced temporary factor IX normalization in mild hemophilia B who required an epidural infiltration: a case report. *Transfus Apher Sci* 2019;58:512-4.
- [59] Garabet L, Ghanima W, Monceyron Jonassen C, Skov V, Holst R, Mowinkel M-C, et al. Effect of thrombopoietin receptor agonists on markers of coagulation and P-selectin in patients with immune thrombocytopenia. *Platelets* 2019;30:206-12.
- [60] Espitia O, Fouassier M. Thrombin generation test. *Rev Med Interne* 2015;36:690-3.

Manuscrit numéro 2

Dans ce second travail de thèse, le but a été de mettre en place une méthodologie pour évaluer l'hypercoagulabilité sur un modèle de SAPL sur cellules endothéliales artérielles. Pour se faire, nous avons étudié tout d'abord l'impact de la confluence des cellules sur la génération de thrombine. Nous avons démontré que plus la confluence était importante, et plus la génération de thrombine diminuait de manière proportionnelle.

Les cellules endothéliales ont été incubées avec différentes concentrations d'aPL (100, 200 et 500 mg/ml) et durant différents temps pour évaluer l'action de ses anticorps (1, 4, 12 heures). Le potentiel thrombogène était augmenté en fonction de la concentration d'aPL mise en culture. Pour confirmer l'action propre des aPL, nous avons incubé des IgG polyvalentes en grande concentrations (500 mg/ml). Aucune modification du TGT n'a été retrouvée, démontrant le potentiel thrombogène de ces aPL induisant une dysfonction endothéliale.

Enfin, nous avons évalué l'action de ces aPL sur les plaquettes. Les patients souffrant de SAPL ont une hyperagregation plaquettaire. Nous avons démontré que l'incubation d'aPL avec des plaquettes initie l'activation de celles-ci pour aboutir à une agrégation plaquettaire et une génération de thrombine. Il a été démontré que l'activation endothéliale est un déclencheur qui induit une thrombose avec libération de FT et inhibition de l'oxyde nitrique synthase endothéliale dans le SAPL (308–310).

A notre connaissance, il n'existe pas de méthodologie standardisée pour tester la génération de thrombine sur culture de CE. Plusieurs études ont évalué la génération de thrombine induite par les cellules cancéreuses(311–313). Dans notre étude, nous avons évalué différents temps de culture et nous avons montré une diminution significative du niveau de thrombine générée en corrélation avec la confluence. L'inhibition du TGT par une augmentation de la confluence des cultures de CE pourrait être expliquée par les propriétés anticoagulantes de la CE, avec une augmentation de la TM et de l'EPCR au contact du plasma. Ces résultats démontrent l'importance d'étudier le TGT en même temps que la culture cellulaire et d'avoir un contrôle dans chaque essai pour standardiser les résultats comme recommandé par le sous-comité sur le contrôle de l'anticoagulation de l'ISTH (314,315).

Les aPL ont été préincubés avec les CE avant que la génération de thrombine ne soit déclenchée. Une des premières conclusions de notre étude était que l'augmentation de la génération de thrombine dépendait d'une augmentation de la concentration d'aPL. Seul un titre moyen ou élevé d'aPL est pris en compte dans les critères de Sydney pour le diagnostic du SAPL. Cependant, aucune étude n'a rapporté de corrélation entre le risque de thrombose et l'augmentation du titre d'aPL. Nous avons confirmé que les états hypercoagulables sont induits par les aPL et non par les IgG polyvalentes.

D'autres études ont démontré que l'APS ne modifie pas la génération de thrombine dans des conditions standard avec le PPP, mais ne fait qu'allonger le temps de latence, ce qui s'explique par la liaison des phospholipides avec l'aPL et la réaction retardée de coagulation (96). Dans notre étude, la culture des

CE mimait la paroi des vaisseaux et l'incubation des aPL à induire un dysfonctionnement endothélial. La capacité des anticorps anti- β 2GPI à se lier et à activer les CE en culture a été précédemment décrite (316), et nos résultats ont confirmé que l'activation de la CE induit un état prothrombotique. Les résultats d'études *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'implication des plaquettes dans le SAPL. Une étude *in vitro* a montré une interaction entre les anticorps anti- β 2GPI et la GPIb après une transfusion de plaquettes, avec des aPL, induisant une activation plaquettaire et des états prothrombotiques avec libération de PS et production de thromboxane A2 (317). Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans le SAPL et nous avons montré une augmentation de la génération de thrombine lorsque la PRP était utilisé pour déclencher le TGT. Les plaquettes contribuent au phénotype hypercoagulable. Dans un modèle murin de SAPL, Proulle *et al.* ont rapporté que les aPL induisent une activation plaquettaire qui est la première étape de l'activation endothéliale et est nécessaire pour amplifier la formation de fibrine (318). Ces résultats ont été confirmés par l'incubation d'anticorps anti- β 2GPI avec PRP sans FT.



Full Length Article

Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: Evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies

Paul Billoir^a, Sébastien Miranda^b, Louise Damian^b, Vincent Richard^c, Ygal Benhamou^b,
Véronique Le Cam Duchez^{a,*}

^a Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, Rouen University Hospital, Vascular Hemostasis Unit, F 76000 Rouen, France

^b Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, Rouen University Hospital, Department of Internal Medicine, Vascular and Thrombosis Unit, F 76000 Rouen, France

^c Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096 EnVI, 76000 Rouen, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Antiphospholipid syndrome
Endothelial cells
Platelet activation
Thrombin generation
Hypercoagulability

ABSTRACT

Introduction: Circulating antiphospholipid antibodies (APL) induce vascular injury and endothelial dysfunction, which are associated with thrombotic events and/or fetal loss. We developed a model in which calibrated automated thrombin generation (CAT) is carried out in wells lined with cultured endothelial cells. Then we investigated how far b2GPI1 antibodies provoked thrombin generation (TG) enhancing effects in these cells and/or in blood platelets.

Materials and methods: Thrombin generation induced by different concentrations of tissue factor and different levels of endothelial aortic cell confluence was investigated by calibrated automated thrombogram. Endothelial cells were incubated with the purified anti-β2glycoprotein I antibodies of patients with antiphospholipid syndrome (APS). Platelet free plasma and platelet rich plasma were used to study thrombin generation in endothelial cells and platelet reactivity, respectively.

Results: Endothelial cell confluence was negatively correlated with thrombin generation which was dependent on the concentration of APL incubated. Activation of endothelial cells with APL significantly increased thrombin generation triggered by PFP. Triggering by PRP increased thrombinogram parameters. Moreover, anti-β2glycoprotein I antibodies incubated with platelet significantly amplified thrombin formation in PRP and induced platelet activation without tissue factor.

Conclusion: In this *in vitro* study, we demonstrate the feasibility of using thrombin generation test in cultured endothelial cells and suggest the need to realize adjustments to standardize results. The mechanism of prothrombotic states in APS requires endothelial dysfunction and platelet activation. The quantification of thrombin formation shows that APL incubation induces endothelial injury in cultured cells amplified by platelets.

1. Introduction

Antiphospholipid syndrome (APS) is a systemic autoimmune disorder defined by association of vascular injury and persisting antiphospholipid antibodies (APL) [1]. According to several studies and the first results of the RAPS trial, vitamin K antagonist is the first choice drug for thrombotic events in APS [2,3,4]. A recent study evaluated hydroxychloroquine as a promising therapeutic option [5].

The procoagulant effects of APL have been described as overexpression of tissue factor (TF) in patients [6] and in endothelial cells [7]. Moreover, modulation of protein C and protein S expression induces acquired activated protein C resistance (aPCR) [8]. Additionally, a decrease of endothelial nitric oxide synthase [9] and reduced flow-

mediated dilatation in APS demonstrating endothelial injury [10] has been observed. Platelet activation in APS and a binding of APL in platelet thrombus have been demonstrated [11]. Activation of the platelet signalling pathway modifies glycoprotein IIb/IIIa conformation and CD 62 expression which induce prothrombotic states [12]. These interactions in the vessel wall predispose to hypercoagulable states. Finding a test to evaluate the recurrent risk of thrombosis in APS patients is essential.

Thrombin generation (TG) induces localized activation of several serine proteases and the final product of the coagulation process is fibrin. Thrombin properties combine pro- and anti-coagulant functions [13]. Thrombin generation test (TGT) evaluates the activation and inhibition of the clotting system [14]. For this reason, TGT has already

* Corresponding author at: Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire Charles Nicolle, 1 rue de Gemont, 76031 Rouen, France.
E-mail address: Veronique.Le-Cam@chu-rouen.fr (V. Le Cam Duchez).

<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.07.021>

Received 4 December 2017; Received in revised form 31 May 2018; Accepted 14 July 2018

Available online 17 July 2018

0049-3848/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

been used to study APS. APL induce prolonged lagtime and an acquired resistance in presence of activated protein C evaluated with thrombinography [15]. Moreover, in APS, TGT could predict superficial vein thrombosis occurrence [16] and monitor anticoagulation [17]. In parallel, TGT has been developed and validated in cancer cell cultures [18,19,20]. Although TGT is commonly used as an evaluation tool of thrombotic risk, internal quality control is required to standardize results and to reduce intra assay imprecision [21,22,23].

Quiescent endothelial cells (EC) regulate clotting formation, by activating protein C with thrombomodulin and endothelial protein C receptor, and contribute to preventing cell adhesion. Conversely, there is an opposing mechanism of activated EC which facilitate blood coagulation by expressing procoagulant factor and adhesion molecules. Contact phase influence [24] has been reported in EC using TGT, but this approach has not yet been used in APS.

The objective of this study was first, to develop TGT in EC cultures and second, to use TGT in EC cultures and in platelet rich plasma to characterize the direct pathogenic effect of APL.

2. Material and methods

2.1. Endothelial cell cultures

Immortalized endothelial aortic cells TeloHAEC (ATCC® CRL-4052™, United States) were used for TG. Cells were expanded with Endothelial Cell Growth Kit VEGF (ATCC® PCS-100-041™, United States), with 10 units/ml of penicillin and 10 µg/ml of streptomycin (P4333, Sigma Aldrich, France) at 37 °C in 100% humidified atmosphere with 5% CO₂. Adherent cultures were developed in 75 cm² culture flasks. At 90% confluence, cells were incubated with trypsin for 5 min at 37 °C then Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline was added to neutralise trypsin. Cell suspensions were centrifuged 5 min at 150g and pellets were suspended in culture medium. 100 µl of this suspension were spiked in each well in 96-well plates adapted to TG (5000 cells/well). Cells were cultured and adhered at 37 °C in 100% humidified atmosphere with 5% CO₂. Incubation of APL with endothelial cells was realized 4 h before TGT in culture medium.

2.2. Plasma samples

- Platelet free plasma (PFP) samples for TG were obtained from healthy volunteers, who had no history of thrombosis or congenital thrombophilia. Blood samples were taken by antecubital venepuncture and collected in vacutainer tubes containing buffered 0.109 M trisodium citrate (1 part of citrate 3.2%/nine parts of blood). PFP was prepared by double centrifugation of citrate blood for 15 min at 2500g.
- Platelet rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation of citrated blood for 10 min at 150g. Supernatant PRP was removed and adjusted at 150 G/l by autologous PFP obtained after centrifugation of remaining blood for 15 min at 2500g. PRP samples were obtained from healthy volunteers without thrombotic or bleeding history and with normal platelet aggregation tests.

2.3. Automated measurement of thrombin generation

In PFP, TG was triggered by a normal concentration of phospholipid (4 µmol/l) and a different concentration of TF (1 or 5 pmol/l) (respectively, low platelet-poor plasma (PPP) reagent or PPP reagent, Diagnostica Stago, Asnières, France). In PRP, TG was triggered by 1 pmol/l of TF (PRP reagent, Diagnostica Stago, Asnières, France) or 5 pmol/l of TF and 1 µmol/l of phospholipid (high PPP reagent with dilution 1:4, Diagnostica Stago, Asnières, France). TG was measured by Calibrated Automated Thrombography and Fluorocan Ascent Fluorometer (Thermoscientific Labsystems, Helsinki, Finland). Experiment was done in duplicate for EC and EC incubated with APL.

Four wells were used per group.

2.4. Experimental procedure for thrombin generation test in endothelial cells

Culture medium was removed from the plate. In one well containing EC, 80 µl of PFP or PRP and 20 µl of triggering reagent (mix of TF and phospholipid) were added. In another well, PFP or PRP (Thrombin calibrator, Diagnostica Stago, Asnières, France) was added, then the plate was incubated at 37 °C. A combination of calcium (to begin TG) and fluorogenic substrate (FluCa kit, Diagnostica Stago, Asnières, France) was added. Conversion of fluorogenic substrate was measured and TG parameters (lagtime, endogenous thrombin potential (ETP) and peak concentration) were calculated by Thromboscope software (version 3.0.029; Thromboscope BV, Maastricht, The Netherlands).

2.5. Isolation of antiphospholipid antibodies

2.5.1. Patients

Blood samples were obtained from six patients with primary arterial APS who fulfilled the international classification criteria for APS [25]. Blood samples were tested according to the updated criteria for lupus-anticoagulant, anti-β2GPI, and anticardiolipin antibodies. Patients were exclusively positive for anti-β2GPI IgG. Written informed consent was obtained from each patient. The study was conducted according to the recommendations set forth by the declaration of Helsinki on biomedical research involving human subjects.

2.5.2. IgG purification

Blood samples were centrifuged for 15 min at 3500g to obtain serum and total IgG was purified from serum samples by protein G-Sepharose affinity chromatography (Nab prot G spin column, Fischer Scientific France). Samples from patients with APS or healthy donors were eluted with Tris-glycine (pH 2.5), and then dialyzed against phosphate-buffered saline, concentrated, and solubilized with phosphate-buffered saline (PBS 1X).

The concentration of purified APL IgG was determined using the nephelometric method (BN II system, Siemens Healthineers). The sample containing anti-β2GPI-IgG had an activity of 1860 UA/ml for anti-β2GPI and a concentration of 146.4 UA/ml for anticardiolipin corresponding to 2.48 g/l of IgG. Nonspecific IgG was at 9.48 g/l.

For EC with or without purified APL, TGT was performed in duplicate.

We performed the same protocol for polyvalent immunoglobulin from healthy controls.

2.6. Statistical analysis

All data were expressed as mean ± SD. Data were analyzed with Graphpad Prism 5.0 and with Excel 2016. Mann-Whitney *U* test, Kruskal Wallis test and a Pearson correlation were used. *p*-Values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Effect of endothelial cell confluence on thrombin generation

The addition of PFP and a low concentration of TF (low PPP reagent) did not allow detection of quantifiable TG with calibrated automated thrombogram, even in low confluence (30%).

The addition of PFP and a normal concentration of TF (5 pmol/l) induced quantifiable TG. ETP and peak decreased with confluence (Fig. 1A). Thrombin was not detectable at 100% confluence. We performed a Kruskal Wallis test (*p* < 0.001 for ETP and *p* = 0.0086 for peak) and confirmed a significant difference with a Mann Whitney test (for ETP, *p* = 0.047 between 30% and 50% confluence, and between 50% and 90% of confluence) (for peak, *p* = 0.047 between 30% and

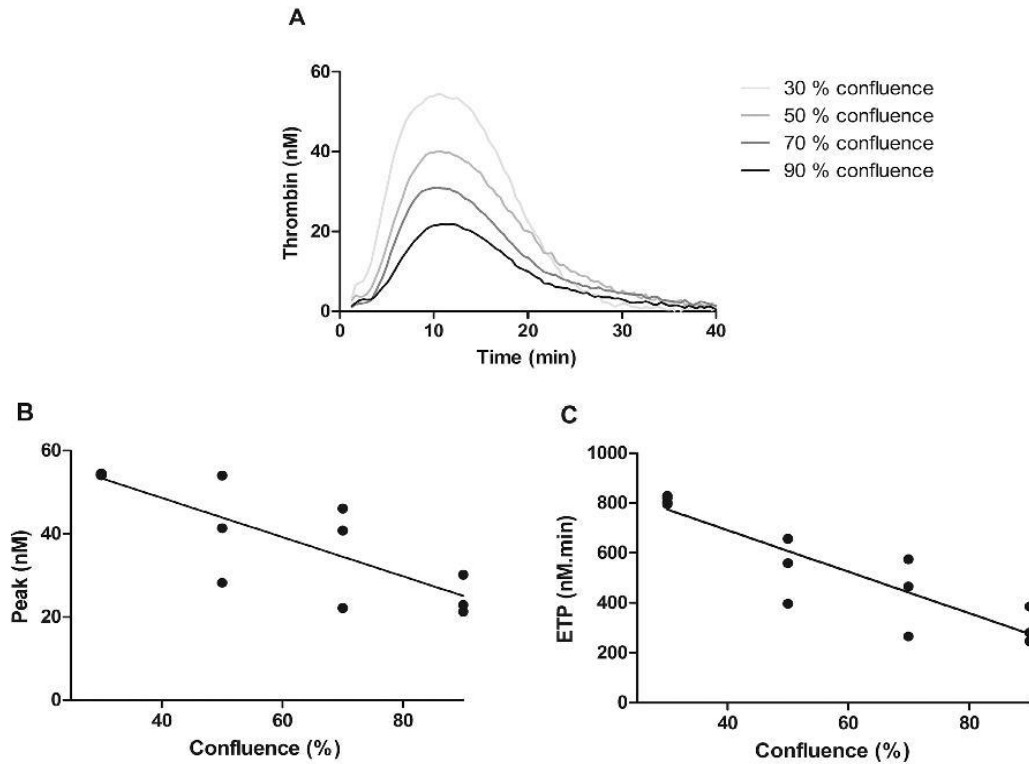


Fig. 1. Variation of thrombin generation with confluence in endothelial cells. A. Thrombin generation triggered with 5 pM of TF and 4 μM of phospholipid by calibrated automated thrombinography (n = 4 by confluence). Correlation between confluence, peak (B) and ETP (C).

70% of confluence; and between 50% and 90% of confluence).

A significant negative correlation was observed between confluence, peak ($p = 0.0006$; $r = -0.6749$) (Fig. 1B) and ETP ($p < 0.0001$, $r = -0.8942$) (Fig. 1C) with Pearson correlation.

3.2. Effect of antiphospholipid antibodies on thrombin generation in endothelial cells

First, we evaluated the effect of increasing concentration of APL incubated with EC (Fig. 2A).

TG was triggered by PFP and PPP reagent. Results were similar for

control (ETP = 545.5 ± 108.8 nM·min; peak = 42.1 ± 10.8 nM) and polyvalent IgG from healthy controls (ETP = 609.1 ± 55.0 nM·min; peak = 44.1 ± 2.5 nM). Results were similar between 100 mg/ml and 250 mg/ml of APL (100 mg/ml: ETP: 1010.7 ± 76.8 nM·min; Peak: 76.82 ± 20.69 nM; 250 mg/ml: ETP: 1017.4 ± 133.4 nM·min; Peak: 91.5 ± 20.69 nM). Level of TG increased in APL to 100 mg/ml and to 250 mg/ml compared to control and polyvalent IgG ($p = 0.047$).

However, a significant increase of ETP (1416.1 ± 152.3 nM·min) ($p = 0.028$) and thrombin peak (212.3 ± 33.24 nM) ($p < 0.05$) was observed with 500 mg/ml compared to low concentration of APL, suggesting a hypercoagulable state with increasing APL level.

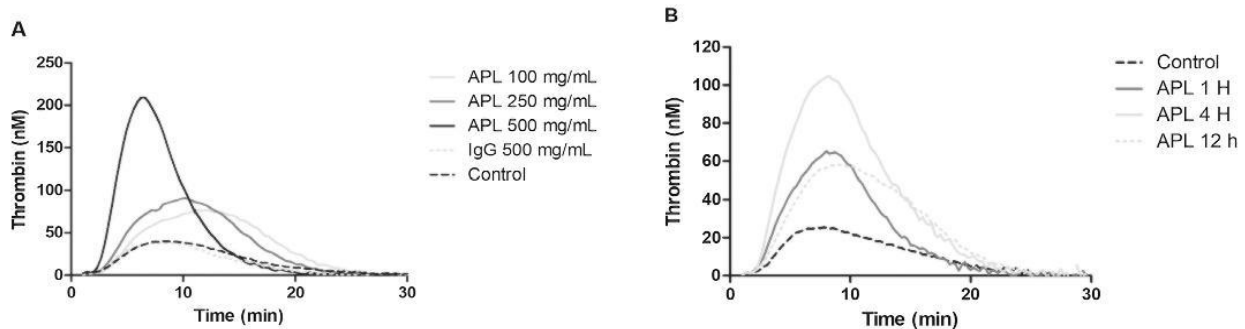


Fig. 2. Effect of different concentration and incubation time of APL incubated with endothelial cells in thrombin generation. A. Thrombin generation was realized at 70% of confluence. APL: APL incubated 4 h with endothelial cells at different concentration. IgG: non-specific immunoglobulin from healthy donor. B. 100 mg/ml APL were incubated 1, 4, or 12 h with endothelial cells.

Furthermore, nonspecific IgG did not increase TG, even at 500 mg/ml.

The incubation time of APL with EC was also evaluated (Fig. 2B). A global increase in thrombin generation was observed between control (ETP = 396.5 ± 98.9 nM·min; Peak: 30.3 ± 8.3 nM), 1 h of APL incubation (ETP = 771.8 ± 108.8 nM·min; Peak: 64.9 ± 15.0 nM) and 4 h of APL incubation (ETP = 1178.4 ± 126.1 nM·min; Peak: 97.6 ± 30.0 nM).

A significantly higher ETP was observed with 4 h of APL incubation vs 1 h of incubation ($p = 0.002$) and peak ($p = 0.014$).

At 12 h, we confirmed a decrease in ETP and peak since $\alpha 2$ macroglobulin activity was not corrected by software. $\alpha 2$ macroglobulin is able to bind thrombin and underestimates thrombin measurement.

As our objective was to evaluate the pro coagulant effect of APL on EC, we compared TG at the same confluence with 100 mg/ml of APL incubated for 4 h.

When the trigger was an association of PFP and a low concentration of TF (Low PPP reagent), thrombin was only generated at 30% confluence (ETP: 228.4 ± 101.6 nM·min; Peak: 15.55 ± 7.2 nM) in EC incubated with APL. In other confluences, no thrombin was detectable.

With the addition of PFP and a normal concentration of TF (PPP reagent), TG was clearly increased in EC incubated with APL, whatever the confluence (Table 1). Only peak at 50% confluence was not significantly increased. At 100% confluence, TG was null in untreated EC but detectable in EC incubated with APL, as previously described.

3.3. Influence of platelet and antiphospholipid antibodies on thrombin generation

When thrombin generation was triggered by PRP and a low concentration of TF (1 pM) in untreated EC or in EC incubated with APL, no thrombin was detected.

When PRP was associated with 5 pM of TF and 1 μ M of phospholipid (high PPP reagent 1:4), at 50% confluence and 100 mg/mL of APL, peak ($p = 0.057$) and ETP ($p = 0.11$) did not increase significantly. In the same conditions, but at 70% confluence, both ETP and peak increased ($p < 0.05$). No thrombin was generated in EC at 100% confluence (Table 2).

In addition, we added 100 mg/ml of APL to PRP. ETP (PRP: 1256.1 ± 86.1 nM·min versus PRP with APL: 1528.6 ± 137.5 nM·min; $p < 0.05$) and peak (PRP: 121.1 ± 9.6 nM versus PRP with APL: 165.5 ± 17.8 nM; $p < 0.05$) were increased significantly (Fig. 3A).

3.4. Activation of platelet with antiphospholipid antibodies

We evaluated the possibility of inducing thrombin generation in PRP incubated with APL (100 mg/ml) without the use of TF to start reaction. Without EC, thrombin was generated with ETP (1243.4 ± 60.2 nM·min) and peak (97.04 ± 6.69 nM). Among 4 wells, only 1 PRP reacted in thrombin generation without APL incubation (ETP: 890.6 nM·min; peak: 46.2 nM) and thrombin generation was not detectable in the 3 others (Fig. 3B). With cultivated EC, thrombin generation was not detectable.

4. Discussion

As previously described, APS is an autoimmune disease with persisting APL which induce vascular injury [26]. Thrombosis events are due to APL binding annexin A5 which normally inhibits coagulation with repulsive charges [27]. However, other mechanisms have also been evoked. Indeed, it has been demonstrated that endothelial activation is a trigger which induces thrombosis with TF release and inhibition of endothelial nitric oxide synthase [7,28,29].

Previous studies have shown the interest of TGT as a method to investigate the activation and inhibition of coagulation in APS [15,16,17]. However, to our knowledge, there is no standardized methodology to test thrombin generation in EC culture. Several studies

Table 1
Comparison of thrombogram with confluence in EC and EC incubated with APL.

Confluence	30%		50%		70%		90%		100%	
	EC (n = 4)	EC + APL (n = 4)	EC (n = 4)	EC + APL (n = 4)	EC (n = 4)	EC + APL (n = 4)	EC (n = 4)	EC + APL (n = 4)	EC (n = 4)	EC + APL (n = 3)
ETP (nM·min)	811.49 ± 48.0	1143.9 ± 102.1*	545.5 ± 108.8	785.7 ± 30.0*	435.3 ± 131.5	734.3 ± 64.7*	292.8 ± 70.2	662.6 ± 256.7*	ND	313.8 ± 124.5
Peak (nM)	54.3 ± 0.15	86.3 ± 10.0*	42.4 ± 10.8	52.4 ± 2.3	36.3 ± 11.6	56.9 ± 7.6*	23.2 ± 5.7	49.7 ± 29.5*	ND	31.0 ± 21.3

Thrombin generation was realized with 5 pM of TF and 4 μ M of PL. Results are expressed as mean ± SD. EC: endothelial cells; EC + APL: endothelial cells incubated with APL; ND: non-detectable. * $p < 0.05$.

Table 2
Effect of PRP in thrombin generation.

Confluence	50%		70%		90%		100%	
	EC (n = 4)	EC + APL (n = 4)	EC (n = 4)	EC + APL (n = 4)	EC (n = 2)	EC + APL (n = 3)	EC (n = 4)	EC + APL (n = 4)
ETP (nM·min)	1005.4 ± 187.9	1436.4 ± 263.1	920.2 ± 206.9	1208.4 ± 17.4*	1301.3 ± 3.5	1525.5 ± 279.4	ND	954.7 ± 456.8*
Peak (nM)	87.0 ± 17.4	113.5 ± 20.2	89.5 ± 19.6	125.6 ± 8.7*	131.7 ± 5.9	166.3 ± 40.0	ND	91.0 ± 41.9*

Comparison was realized with confluence in EC and EC incubated with APL. Thrombin generation was started with 5 pM of TF and 1 μM of PL. Results are expressed as mean ± SD. EC: endothelial cells; EC + APL: endothelial cells incubated with APL, ND: Non-detectable.

* p < 0.05.

have evaluated thrombin generation induced by cancer cells [18,19,20]. In this study, we evaluated different times of culture and we showed a significant decrease of thrombin level correlated with confluence. The inhibition of TGT by an increase of EC culture confluence could be explained by the anticoagulant properties of EC, with an increase of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in contact with plasma. These results demonstrate the importance of studying TGT at the same time of cell culture and of having a control in each assay to standardize results as recommended by the Subcommittee on Anticoagulation Control of the ISTH [22,23].

In the current study, APL were pre-incubated with EC before thrombin generation was triggered. An original finding of our study was the increase in thrombin generation dependent on an increase in APL concentration. Only medium or high titer of APL are considered in the Sydney criteria for the diagnosis of APS. However, no study has reported a correlate risk of thrombosis with an increase in APL titer. We have confirmed that hypercoagulable states are induced by APL and not by polyvalent IgG.

In our study using different concentrations of TF in standard conditions, APL incubated with EC significantly increased thrombin generation. Other studies have demonstrated that APS does not modify thrombin generation in standard conditions with PFP, but only extends the lagtime, explained by APL binding phospholipids and delayed reaction [30]. However, an acquired protein C resistance was observed in ETP and peak when activated protein C was added [30]. In our study, EC culture mimed vessel wall and incubation of APL may have induced an endothelial dysfunction. The ability of anti-β2GPI antibodies to bind and activate endothelial cells in culture has been previously described [31], and our results confirmed that activation of EC induces a prothrombotic state.

Evidence based results of *in vitro* and *in vivo* studies demonstrated platelet implication in APS. An *in vitro* study showed interaction between anti-β2GPI antibodies and glycoprotein Ib after platelet infusion with APL, inducing platelet activation and prothrombotic states with

release of P selectin and production of thromboxane A2 [12]. Therefore, platelets play a pivotal role in APS and we showed an increase of thrombin generation when PRP was used to trigger TG. More specifically, APL had a direct action in platelet and amplified thrombin formation when we studied, at the same confluence, the incubation of anti-β2GPI antibodies with PRP before starting TG. Therefore, platelet contributed to a hypercoagulable phenotype. In a mouse model of APS, Proulle et al. reported that APL induce platelet activation which is the first step of endothelial activation and is required to amplify fibrin formation [11]. These results were confirmed by incubation of anti-β2GPI antibodies with PRP and without TF. APL induced platelet activation and thrombin was generated without normal trigger. The up-regulation of expression and the plasma concentration of TF have been well described in APS [6]. TF is a transmembrane glycoprotein which initiates coagulation cascade. An increase of TF in APS induces the thrombotic potential of disease. APL incubation with EC, which have anticoagulant properties, was not enough to start a reaction.

Nevertheless, our study presents some limitations. First, we were only able to demonstrate an indirect activation of endothelial cells and platelet with thrombin generation. We did not study the biological parameters of activation such as the release of E selectins and P selectins. Our objective was to focus on the procoagulant state with APL incubation in aortic endothelial cells. Our results warrant confirmation in studies performed on venous endothelial cells. Second, our results were different depending on confluence which could present a bias. However, we reduced the intra variability of results by performing thrombin generation in the same series.

5. Conclusion

In this study, we demonstrate the feasibility of using thrombin generation test in cultured endothelial cells. This method allows the assessment of the procoagulant phenotype of interaction of anti-β2GPI antibodies with platelet and endothelial cells. We suggest that thrombin

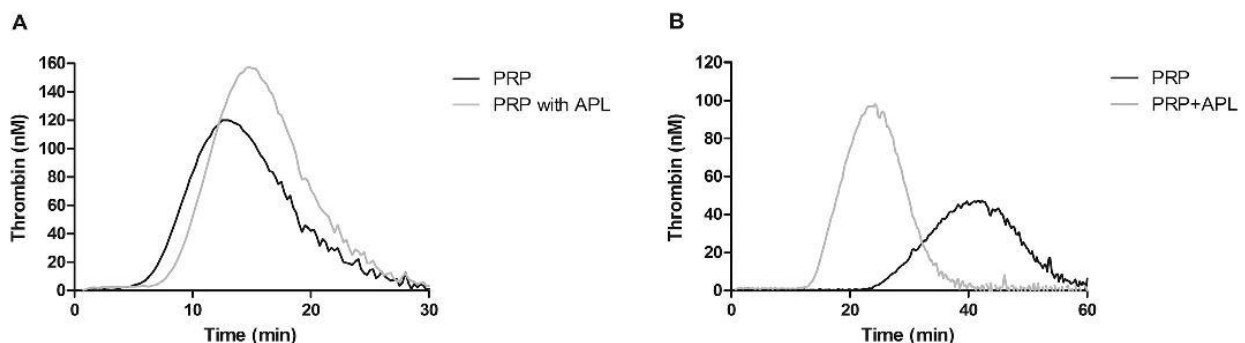


Fig. 3. Increasing effect of incubated APL with PRP in thrombin generation. A. Endothelial cells and platelet were incubated with APL. PRP: endothelial cells incubated 4 h with APL. PRP with APL: endothelial cells incubated 4 h with APL and 100 mg/ml of APL were added in PRP. B. Evaluation of platelet activation with APL incubation. Thrombin generation was started without tissue factor and endothelial cells. PRP: PRP adjusted at 150 G/L. PRP with APL: PRP incubated with 100 mg/ml adjusted at 150 G/L.

generation test could be used in cultured cells with the objective of improving therapeutic approaches for patients with APS.

Disclosure of conflict of interests

The authors state that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for editing the manuscript. We are indebted to Thomas Dufлот, PharmD for statistical analysis.

References

- R. Cervera, J.-C. Piette, J. Font, M.A. Khamashta, Y. Shoenfeld, M.T. Camps, S. Jacobsen, G. Lakos, A. Tincani, I. Kontopoulou-Griva, M. Galeazzi, P.L. Meroni, R.H.W.M. Derksen, P.G. de Groot, E. Gromnica-Ihle, M. Baleva, M. Mosca, S. Bombardieri, F. Houssiau, J.-C. Gris, I. Quéré, E. Hachulla, C. Vasconcelos, B. Roch, A. Fernández-Nebro, M.-C. Boffa, G.R.V. Hughes, M. Ingelmo, Euro-phospholipid project group, antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients, *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 1019–1027.
- G. Finazzi, R. Marchioli, V. Brancaccio, P. Schinco, F. Wisloff, J. Musial, F. Baudo, M. Berrettini, S. Testa, A. D'Angelo, G. Tognoni, T. Barbui, A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS), *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 848–853, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01340.x>.
- M.A. Crowther, J.S. Ginsberg, J. Julian, J. Denburg, J. Hirsh, J. Douketis, C. Laskin, P. Fortin, D. Anderson, C. Kearon, A. Clarke, W. Geerts, M. Forgie, D. Green, L. Costantini, W. Yacura, S. Wilson, M. Gent, M.J. Kovacs, A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome, *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 1133–1138, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035241>.
- H. Cohen, B.J. Hunt, M. Efthymiou, D.R.J. Arachchilage, L.J. Mackie, S. Clawson, Y. Sylvestre, S.J. Machin, M.L. Bertolaccini, M. Ruiz-Castellano, N. Muirhead, C.J. Doré, M. Khamashta, D.A. Isenberg, R.A.P.S. Trial Investigators, Rivaroxaban versus warfarin to treat patients with thrombotic antiphospholipid syndrome, with or without systemic lupus erythematosus (RAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 2/3, non-inferiority trial, *Lancet Haematol.* 3 (2016) e426–e436, [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(16\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(16)30079-5).
- C. Belizna, Hydroxychloroquine as an anti-thrombotic in antiphospholipid syndrome, *Autoimmun. Rev.* 14 (2015) 358–362, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.12.006>.
- A.V. Kinev, R.A.S. Roubey, Tissue factor in the antiphospholipid syndrome, *Lupus* 17 (2008) 952–958, <https://doi.org/10.1177/0961203308096662>.
- O. Amengual, T. Atsumi, M.A. Khamashta, G.R. Hughes, The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome, *Thromb. Haemost.* 79 (1998) 276–281.
- J. Kassis, C. Neville, J. Rauch, L. Busque, E.R. Chang, L. Joseph, M. Le Comte, R. Subang, P.R. Fortin, Antiphospholipid antibodies and thrombosis: association with acquired activated protein C resistance in venous thrombosis and with hyperhomocysteinemia in arterial thrombosis, *Thromb. Haemost.* 92 (2004) 1312–1319, <https://doi.org/10.1160/TH04-03-0138>.
- M. Charakida, C. Besler, J.R. Batuca, S. Sangle, S. Marques, M. Sousa, G. Wang, D. Tousoulis, J. Delgado Alves, S.P. Loukogeorgakis, C. Mackworth-Young, D. D'Cruz, T. Luscher, U. Landmesser, J.E. Deanfield, Vascular abnormalities, paraoxonase activity, and dysfunctional HDL in primary antiphospholipid syndrome, *JAMA* 302 (2009) 1210–1217, <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1346>.
- Y. Benhamou, J. Bellien, G. Armengol, E. Brakenhielm, S. Adriouch, M. Iacob, I. Remy-Jouet, V. Le Cam-Duchez, C. Monteil, S. Renet, F. Jouen, L. Drouot, J.-F. Menard, J.-Y. Borg, C. Thuillez, O. Boyer, H. Levesque, V. Richard, R. Joannides, Role of toll-like receptors 2 and 4 in mediating endothelial dysfunction and arterial remodeling in primary arterial antiphospholipid syndrome, *Arthritis Rheumatol.* 66 (2014) 3210–3220, <https://doi.org/10.1002/art.38785>.
- V. Proulle, R.A. Furie, G. Merrill-Skoloff, B.C. Furie, B. Furie, Platelets are required for enhanced activation of the endothelium and fibrinogen in a mouse thrombosis model of APS, *Blood* 124 (2014) 611–622, <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-554980>.
- W. Zhang, F. Gao, D. Lu, N. Sun, X. Yin, M. Jin, Y. Liu, Anti-β2 glycoprotein I antibodies in complex with β2 glycoprotein I induce platelet activation via two receptors: apolipoprotein E receptor 2 and glycoprotein Iβ, *Front. Med.* 10 (2016) 76–84, <https://doi.org/10.1007/s11684-015-0426-7>.
- H.M.H. Spronk, J.W.P. Govers-Riemslog, H. ten Cate, The blood coagulation system as a molecular machine, *BioEssays* 25 (2003) 1220–1228, <https://doi.org/10.1002/bies.10360>.
- H.C. Hemker, R. Al Dieri, E. De Smedt, S. Béguin, Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system, *Thromb. Haemost.* 96 (2006) 553–561.
- S. Liestol, P.M. Sandset, M.-C. Mowinkel, F. Wisloff, Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 2204–2210, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02734.x>.
- S. Zuily, V. Regnault, F. Guillemain, P. Kaminsky, A.-C. Rat, T. Lecompte, D. Wahl, Superficial vein thrombosis, thrombin generation and activated protein C resistance as predictors of thromboembolic events in lupus and antiphospholipid patients. A prospective cohort study, *Thromb. Res.* 132 (2013) e1–e7, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.04.012>.
- M. Efthymiou, A.S. Lawrie, I. Mackie, D. Arachchilage, P.J. Lane, S. Machin, H. Cohen, Thrombin generation and factor X assays for the assessment of warfarin anticoagulation in thrombotic antiphospholipid syndrome, *Thromb. Res.* 135 (2015) 1191–1197, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.03.030>.
- A. Rousseau, P. Van Dreden, E. Mbemba, I. Elalamy, A. Larsen, G.T. Gerotziafas, Cancer cells BXP3 and MCF7 differentially reverse the inhibition of thrombin generation by apixaban, fondaparinux and enoxaparin, *Thromb. Res.* 136 (2015) 1273–1279, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.08.009>.
- M. Sassi, T. Chakroun, E. Mbemba, P. Van Dreden, I. Elalamy, A.K. Larsen, G.T. Gerotziafas, The antithrombotic potential of Tinzaparin and enoxaparin upon thrombin generation triggered in vitro by human ovarian Cancer cells IGROV1, *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.* 23 (2017) 155–163, <https://doi.org/10.1177/1076029616665922>.
- G.T. Gerotziafas, V. Galea, E. Mbemba, M. Sassi, M.-P. Roman, A. Khaterchi, P. van Dreden, M. Japcowitz, J.P. Lotz, J.F. Bernaudin, J. Fareed, M. Hatmi, I. Elalamy, Effect of low molecular weight heparins and fondaparinux upon thrombin generation triggered by human pancreatic cancer cells BXP3C, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 12 (2014) 893–902.
- Y. Dargaud, A.S. Wolberg, R. Luddington, V. Regnault, H. Spronk, T. Baglin, T. Lecompte, H. Ten Cate, C. Negrier, Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study, *Thromb. Res.* 130 (2012) 929–934, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.07.017>.
- J. Perrin, F. Depasse, T. Lecompte, French-speaking CAT group and under the aegis of GEHT, French-speaking CAT group (all in France unless otherwise stated), French-speaking CAT group all in France unless otherwise stated, Large external quality assessment survey on thrombin generation with CAT: further evidence for the usefulness of normalisation with an external reference plasma, *Thromb. Res.* 136 (2015) 125–130, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.12.015>.
- Y. Dargaud, R. Luddington, E. Gray, T. Lecompte, T. Siegemund, T. Baglin, J. Dargaud, V. Regnault, A. Siegemund, C. Negrier, Standardisation of thrombin generation test—which reference plasma for TGT? An international multicentre study, *Thromb. Res.* 125 (2010) 353–356, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2009.11.012>.
- L.L.A. Geenen, M.J. Post, D.G.M. Molin, G.W.H. Schurink, J.G. Maessen, R. van Oerle, H. ten Cate, H.M.H. Spronk, Coagulation on endothelial cells: the under-exposed part of Virchow's triad, *Thromb. Haemost.* 108 (2012) 863–871, <https://doi.org/10.1160/TH12-04-0269>.
- S. Miyakis, M.D. Lockshin, T. Atsumi, D.W. Branch, R.L. Brey, R. Cervera, R.H.W.M. Derksen, P.G.D.E. Groot, T. Koike, P.L. Meroni, G. Reber, Y. Shoenfeld, A. Tincani, P.G. Vlachoyiannopoulos, S.A. Kriilis, International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS), *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 295–306, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x>.
- G. Ruiz-Irastorza, M. Crowther, W. Branch, M.A. Khamashta, Antiphospholipid syndrome, *Lancet Lond. Engl.* 376 (2010) 1498–1509, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60709-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60709-X).
- J.H. Rand, X.X. Wu, A.S. Quinn, D.J. Taatjes, Resistance to annexin A5 anticoagulant activity: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome, *Lupus* 17 (2008) 922–930, <https://doi.org/10.1177/0961203308095029>.
- S.S. Pierangeli, M. Colden-Stanfield, X. Liu, J.H. Barker, G.L. Anderson, E.N. Harris, Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo, *Circulation* 99 (1999) 1997–2002.
- C. Mineo, Inhibition of nitric oxide and antiphospholipid antibody-mediated thrombosis, *Curr. Rheumatol. Rep.* 15 (2013) 324, <https://doi.org/10.1007/s11926-013-0324-4>.
- V. Regnault, S. Béguin, D. Wahl, E. de Maistre, H. Coenraad Hemker, T. Lecompte, Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants, *Thromb. Haemost.* 89 (2003) 208–212.
- R. Simantov, J.M. Lasala, S.K. Lo, A.E. Gharavi, L.R. Sammaritano, J.E. Salmon, R.L. Silverstein, Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies, *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 2211–2219, <https://doi.org/10.1172/JCI18276>.

Manuscrit numéro 3

Ce troisième travail de thèse, signé en deuxième auteur, était centré sur la modulation du phénotype pro-thrombotique du SAPL par l'HCQ. Ainsi nous avons utilisé notre modèle murin de SAPL obtenu après injection d'aPL issus de patients, sur lequel des thromboses artérielles mésentériques et carotidiennes ont été induites à l'aide du chlorure de fer. Enfin, nous avons eu recours à des cellules endothéliales humaines aortiques mises en culture en présence d'aPL pour affiner l'exploration du statut pro thrombotique.

La première partie du travail a consisté à réaliser la mise au point du TGT sur plasma de souris. Nous avons prélevé des souris contrôles et réaliser le TGT avec différentes quantités de plasma et différentes concentrations de FT. Physiologiquement, les souris ont des concentrations plus importantes des différents facteurs de la coagulation, d'où la nécessité de mettre des quantités de plasma et des concentrations en FT plus faibles (impossibilité de lire la courbe de génération de thrombine pour des concentrations en FT > 1 pM)

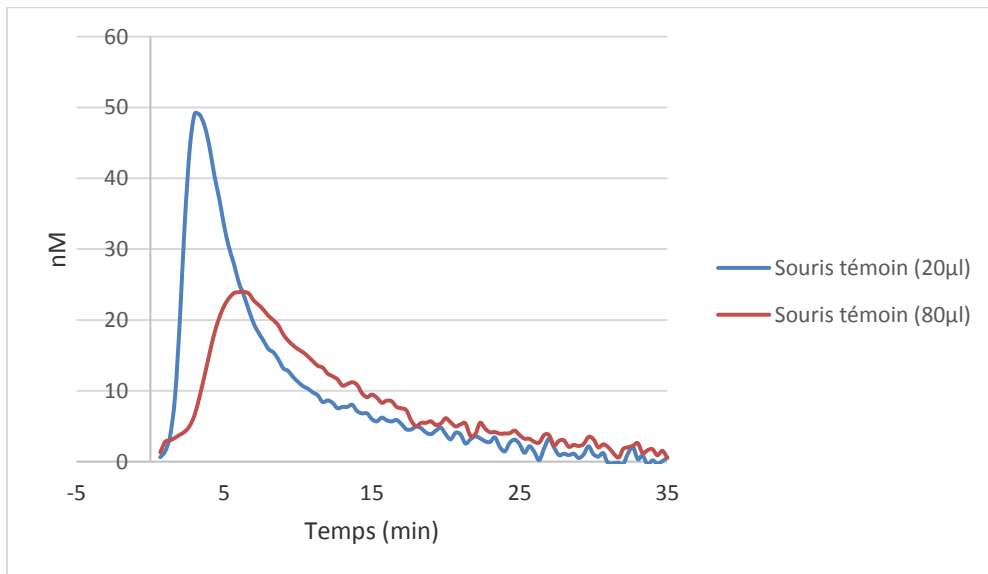


Figure 15. Mise au point du TGT sur plasma de souris

Les résultats des expérimentations animales ont montré un impact majeur de l'injection des aPL sur la rapidité et l'étendue des thromboses tant mésentériques que carotidiennes comparativement aux animaux contrôles. L'état pro thrombotique induit par l'injection des aPL était confirmé *in vitro* par les tests de génération de thrombine. Ainsi, le « peak » et l'ETP des animaux exposés aux aPL étaient plus importants que ceux des animaux contrôles. Cette différence entre les groupes de souris disparaissait après gavage quotidien des souris par l'HCQ (6mg/kg/j). Le traitement par HCQ permettait de normaliser les paramètres de génération de thrombine des souris APL.

Par ailleurs, afin d'étudier le rôle de la dysfonction endothéliale sur l'induction de cet état pro thrombotique, des cellules endothéliales humaines aortiques ont été incubées en présence d'aPL.

L'expression de la thrombomoduline était réduite dans les cellules exposées aux aPL. Nous avons également constaté que de façon similaire aux expérimentations animales, l'incubation des cellules avec des aPL induisait un ETP plus important qu'en l'absence d'aPL. L'utilisation d'HCQ dans les cultures de cellules endothéliales permettait d'obtenir un niveau basal de génération de thrombine témoignant d'une restauration du pouvoir anticoagulant naturel des cellules endothéliales. Ceci était illustré notamment par la normalisation des taux de thrombomoduline exprimés par les cellules endothéliales. Ce mécanisme explique la RPCa retrouvée chez les patients SAPL, et la diminution de RPCa sous HCQ. Ainsi nous avons montré que la modulation de cette dysfonction par l'HCQ a permis de restaurer un état de coagulabilité basal.

RESEARCH ARTICLE

Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced inflammation and endothelial dysfunction

Sébastien Miranda^{1,2,3}, Paul Billoir^{2,4}, Louise Damian^{1,2,3}, Pierre Alain Thiebaut^{1,2,3}, Damien Schapman^{3,5}, Maelle Le Besnerais^{1,2,3}, Fabienne Jouen^{3,6}, Ludovic Galas^{3,5}, Hervé Levesque^{1,2,3}, Véronique Le Cam-Duchez^{2,4}, Robinson Joannides^{2,3}, Vincent Richard^{2,3}, Ygal Benhamou^{1,2,3*}

1 Rouen University Hospital, Department of Internal Medicine, Rouen, France, **2** Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096 EnVI, Rouen, France, **3** University of Rouen, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen, France, **4** Rouen University Hospital, Department of Vascular Haemostasis, Rouen France, **5** Univ, Inserm, UNIROUEN, PRIMACEN, Cell Imaging Platform of Normandy, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France, **6** Inserm U1234, Rouen, France

* ygal.benhamou@chu-rouen.fr



OPEN ACCESS

Citation: Miranda S, Billoir P, Damian L, Thiebaut PA, Schapman D, Le Besnerais M, et al. (2019) Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. PLoS ONE 14(3): e0212614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212614>

Editor: Michael Bader, Max Delbruck Centrum fur Molekulare Medizin Berlin Buch, GERMANY

Received: April 10, 2018

Accepted: February 6, 2019

Published: March 14, 2019

Copyright: © 2019 Miranda et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Antiphospholipid antibodies (aPL) promote endothelial dysfunction, inflammation and pro-coagulant state. We investigated the effect of hydroxychloroquine (HCQ) on prothrombotic state and endothelial function in mice and in human aortic endothelial cells (HAEC). Human aPL were injected to C57BL/6 mice treated or not with HCQ. Vascular endothelial function and eNOS were assessed in isolated mesenteric arteries. Thrombosis was assessed both *in vitro* by measuring thrombin generation time (TGT) and tissue factor (TF) expression and *in vivo* by the measurement of the time to occlusion in carotid and the total thrombosis area in mesenteric arteries. TGT, TF, and VCAM1 expression were evaluated in HAEC. aPL increased VCAM-1 expression and reduced endothelium dependent relaxation to acetylcholine. In parallel, aPL shortened the time to occlusion and extended thrombus area in mice. This was associated with an overexpression of TF and an increased TGT in mice and in HAEC. HCQ reduced clot formation as well as TGT, and improved endothelial-dependent relaxations. Finally, HCQ increased the p-eNOS/eNOS ratio. This study provides new evidence that HCQ improves procoagulant status and vascular function in APS by modulating eNOS, leading to an improvement in the production of NO.

Introduction

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disorder defined by recurrent thrombotic events and miscarriages, with positive antiphospholipid antibodies (aPL) [1]. APS may be isolated (primary APS) or associated to an auto immune disease, most often systemic lupus erythematosus (SLE). Pathogenic effects of aPL were first described *in vitro* and are

characterized by endothelial dysfunction, defined by pro-coagulant [2,3] pro-inflammatory [4] and pro-adhesive [5,6] phenotypes.

In parallel we [7] and others [8,9] have reported that flow mediated dilatation (FMD) is decreased in patients with primary and secondary forms of APS, confirming the presence of an endothelial dysfunction in humans. Moreover, our group has recently demonstrated that patients with primary arterial APS also displayed structural arterial changes, associated with a pro-oxidative and pro-coagulant state that was correlated with activation of the TLR2 and TLR4 signalling pathways. Indeed, we demonstrated in an experimental model that the administration to mice of aPL obtained from patients with primary APS, caused marked endothelial dysfunction in small resistance arteries. This alteration was characterized by an altered NO bioavailability, secondary to increased oxidative stress and inflammation [10]. Moreover, all these alterations were prevented by infliximab [11], suggesting a direct effect of TNF α in the pathophysiology of APS.

Hydroxychloroquine (HCQ), an antimalarial drug, is commonly used in rheumatic diseases *i.e.* SLE, but some evidences for its interest in APS have recently emerged [12]. Indeed, HCQ reversed platelet activation induced by human aPL [13,14] and protected the annexin A5 anti-coagulant shield from disruption by APL. One retrospective case series has shown the interest of HCQ in reducing recurrent thrombosis in patients [12]. However, there is a paucity of data supporting the efficacy of HCQ on coagulation parameters. Indeed only one clinical study has recently reported that HCQ reduced soluble TF levels in APS patients, without any change in thromboelastographic test [15]. Therefore, the aim of our preclinical study is to investigate whether HCQ reverses coagulation parameters and modulates vascular endothelial function, and then protects mice against arterial thrombosis.

Methods

Patients and Ig purification

Serum samples were pooled from the serum of six patients with primary arterial APS who fulfilled the international classification criteria for this disease (Table 1), and from 2 healthy blood donors. Written informed consent was obtained from each subject. The study was conducted according to the recommendations set forth by the declaration of Helsinki on biomedical research involving human subjects. The study was approved by the local ethics committee (CPP nord ouest), and all participants provided written informed consent. The study was registers online at <https://eudract.ema.europa.eu/results-web/> under the unique identifier Eudract 2015-002182-38.

Plasma sample were tested according to the updated criteria (1) for lupus-anticoagulant. Serum aCL IgG autoantibodies and anti- β 2GPI IgG were determined by chemiluminescence (QUANTA Flash assays INOVA Diagnostic, Inc) according to the manufacturer's instructions. APL and non-specific IgG samples were obtained by purification of serum samples using

Table 1. Antiphospholipid syndrome patients and antiphospholipid antibody (aPL)-binding characteristics.

	Clinical	Anticardiolipin IgG	Anti β 2GPI IgG	LAC
Patient 1	Stroke	110	599	-
Patient 2	Myocardial infarct	90	2753	-
Patient 3	Stroke	105	1056	-
Patient 4	Stroke	0	4020	-
Patient 5	Renal infarction	115	658	-
Patient 6	stroke	36	429	-

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212614.t001>

protein G-Sepharose affinity chromatography (Nab prot G spin column, Fischer Scientific France) [11]. The samples were positive for anti- β 2GPI-IgG and anticardiolipin IgG when concentrations above 1860 CU and 105 CU, respectively, were measured. Lack of endotoxin was confirmed using the Limulus amoebocyte lysate assay (ThermoFischer).

Preparation of HCQ

HCQ tablets (Plaquenil, Sanofi-Aventis, France), each containing 200mg of the molecule, were mashed and solubilized with NaCl 0.9% at 2 different concentrations: 1mg/mL or 10mg/mL, and then kept at 4°C until used.

Murine model of APS and treatments

Male C57BL/6 mice were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). All experiments were performed in accordance with protocols approved by the Institutional Review Boards. (Comité d'Ethique NORMandie en Matière d'EXpérimentation Animale ENOMEXA n°54).

APS was induced in mice as described previously [7] by a single i.v. injection of a 300 μ L (4.2mg) aPL. Control groups received either saline (sham) or 300 μ L of serum without antiphospholipid activity obtained from healthy donors (NSIg). These injections were given through an insulin syringe (29 G, Myjector U-100 INSULIN). The mice were treated by daily tube-fed with HCQ at 12 μ g/g for 7 days.

On day 7, mice were anesthetized with 3.6mg/kg xylazine (Rompum 2%, Bayer, France) and 90mg/kg ketamine (Imalgène 1000, Merial, France) intraperitoneally and underwent laparotomy.

Ex-vivo vascular studies

A first-order division segment of the mesenteric artery was carefully dissected free with a dissecting microscope. Artery segments 1.5–2.5 mm long and 150–250 μ m in diameter were mounted in a small myograph for isometric tension recording (Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark). Care was taken during the dissection procedure to avoid damage to the endothelium. After equilibration, the vessels were stretched to a physiological tension and allowed to equilibrate for 30 minutes, during which the chamber temperature was progressively increased to 37°C. Normalization procedure was performed as previously described. After a 30-minute equilibration period, segments were precontracted by a single concentration of phenylephrine (10^{-5} M) and relaxations induced by increasing concentrations of acetylcholine (10^{-9} M to 3.10^{-5} M; endothelium-dependent relaxation) or the nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP 10^{-9} to 10^{-5} M; endothelium-independent relaxation) were assessed. Rings were washed twice and allowed to equilibrate for 20 minutes between each concentration-response curve. The contribution of NO to the relaxations to acetylcholine was also assessed by 30 min preincubation with the NO synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine (L-NNA: 10^{-4} M).

To investigate the possible contribution of NADPH oxidase, mesenteric arteries were incubated with apocynin 10^{-4} M for 60 min.

In vivo thrombosis model

Carotid artery thrombosis. Mice were anesthetized as described previously, and the right common carotid artery was exposed. A 1 \times 1 mm strip of filter paper (Whatman n°1) saturated with 10% ferric chloride (FeCl₃) was applied directly to the outer vessel side. At 3 min, the strip was removed, and the vessel was washed with saline solution. An ultrasonic flow probe

(Transonic T410 model) was placed around the carotid artery immediately above the injured site. Blood flow was then recorded for 30 min or 5 min until complete occlusion of the carotid artery, defined by the absence of detectable flow.

Mesenteric artery thrombosis. Mice were anesthetized and the mesentery was exposed. An area containing more than 3 mesenteric divisions was selected for the study. A 10 mm-wide strip of Whatman filter paper was soaked in 10% saturated FeCl₃ solution and applied for 1 min to the surface of the mesentery on the selected area. For platelet labelling, 100 μl Rhodamine 6G 0.05% and 150 μl FITC-dextran 500kDa 0.1% (to label the circulating lumen) were administered through a catheter inserted in the jugular vein. Animal were maintained at 37° by a thermo-controlled plate and the mesentery was perfused with a 37° saline solution. The perfused animal positioned onto a temperature-controlled plate was directly transferred onto a motorized stage of a confocal microscope (TCS LSI, Leica Microsystems, Nanterre, France). To visualize FITC-dextran and Rhodamine 6G, the tissue was illuminated with a 488 nm or a 532 nm wavelength light by means of a laser diode through a confocal laser scanning microscope equipped with a x2 dry objective (NAmax: 0.224, working distance: 39 mm, diameter: 58 mm, Leica Microsystems). In a sequential mode, the green fluorescence emission was detected from 500 to 530 nm and the orange fluorescence emission from 550 to 600 nm. Images were recorded before the FeCl₃ injury and each minute for 30 min. At the end of the experiment a Z stack acquisition was performed to visualize the entire vascular bed in the analysed area. Lumen (FITC labelled) and the sum of thrombosis area were quantified using image J software. Results were expressed as percentage thrombosis surface / total arterial lumen.

TF expression. RNA was isolated from mice aorta using TRIZOL reagent (Invitrogen). Real time (RT)-PCR was performed using primers directed toward TF and 18s RNA (Invitrogen). PCR experiments were performed using a Light Cycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche). Quantitative PCR was performed in a total reaction volume of 20 μL per capillary for the Light Cycler format. The number of cycles at which the best-fit line through the log-linear portion of each amplification curve intersects the noise band was inversely proportional to the log of copy number. The resulting 18S values were used as standard for presentation of the mRNA data of the different transcripts. Oligonucleotide primers were designed according to the published sequences: 18S gene was amplified with forward GTGGAGCGATT TGTCTGGTT and CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG reverse primers of 200 bp each, Tissue factor gene with forward CATGGAGACGGAGACCAACT and TAAAACTTTGGGGCGTTTG reverse primers of 69 bp each, eNOS GACCCTCACCGCTACAACAT and CACAGGATGAG GTTGTCT reverse primers of 77 bp each,

ELISA assays. On day 7, the inferior vena cava was punctured using a 1 mL syringe previously impregnated with heparin (heparin Choay 25.000 IU / 5 mL), to withdraw an average of 0.7 mL whole blood. Blood was then centrifuged at 825 g at 4°C, and plasma was frozen at -80°C. Levels of adhesion molecules VCAM-1, E-selectin and TNFα were measured in plasma by sVCAM-1/CD106 Quantikine ELISA Kit, E-Selectin/CD62E Quantikine ELISA Kit (R&D system), and TNFα Quantikine ELISA Kit (R&D system). The plates were read by a BIOTEK ELx800 analyzer (BIOTEK, France).

Western blot assays. Carotid or mesenteric arteries were homogenized by mechanical disruption in cold Phosphosate Extraction Reagent (Novagen) lysis buffer. The homogenized tissue was separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (7% Criterion XT Tris-Acetate Protein Gel, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Total Proteins were visualized via a stain-free gel imaging system (Bio-rad Gel Doc EZ Membranes). Proteins were transferred on membranes by using a Transblot Turbo transfer system (Bio-rad). Membranes were incubated with the following primary antibodies: Anti TF (Abcam AB151748), anti-eNOS (monoclonal; Transduction Laboratories), anti-P-eNOS (monoclonal; serine 1177;

Serva, Heidelberg, Germany). Membranes were washed again and incubated with a secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). Densities of the specific bands were assessed on a ChemiDoc System with Image Lab Software. Results are presented as a ratio vs. 18S or a P-eNOS/eNOS ratio (to estimate eNOS activation).

Thrombin generation. Assessment of thrombin generation in mice has been previously described [16]. Briefly, blood was drawn from the inferior vena cava into a syringe containing 3.2% sodium citrate (1/10 volume). Blood was centrifuged at 2250 g for 15 min and the supernatant was then centrifuged at 13000 g for 5 min to obtain platelet-free plasma, which was frozen at -80°C .

Thrombin generation was measured in duplicate by calibrated automated thrombography using a Fluoroscan Ascent fluorometer (Thermoscientific LabSystems, Helsinki, Finland). Thrombin generation curves and endogenous thrombin potential (ETP) were calculated using the Thrombinoscope software (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands). 20 μl plasma was mixed with 1 pM tissue factor and 4 μM phospholipids (low PPP reagent, Diagnostica Stago, Asnières, France). The reaction was started with 20 μl FLUCAkit (FLUCAkit, Diagnostica Stago, Asnières, France) containing calcium chloride and the fluorogenic substrate (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Activated protein C (APC) was used at 25 nM and APC resistance (APCr) was assessed by quantification of the effect of APC on ETP and standardized on normalized APCr (nAPCr) determined in the presence (ETP+APC) or absence of APC (ETP). The normalization was done with a pool of healthy mice plasma (HMP).

Cell culture. Immortalized aortic endothelial cells (TeloHAEC; ATCC CRL-4052, USA) were expanded with Endothelial Cell Growth Kit VEGF (ATCC PCS-100-041, USA) supplemented by 10 units/ml penicillin and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (P4333, Sigma Aldrich, France) at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO_2 . Adhesive cultures were developed in 75 cm^2 culture flasks. At 90% confluence, cells were incubated with trypsin for 5 min at 37°C then Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline was added to neutralise trypsin. Cells suspensions were centrifuged 5 min at 150 g and pellets were suspended in culture medium. Cells were seeded at least 24 hours and the confluence was 80–90% in each well prior to incubation with aPL or control IgG.

Treatment: To test the effects of aPL on HAEC, cells were resuspended to a density of 3.10^5 cells/mL in medium and incubated with aPL (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) without or with hydroxychloroquine (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or as a negative control (nonspecific IgG; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) [14] for 4 hours at 37° . To investigate the possible contribution of NADPH oxidase, HAEC were incubated with niflumic acid (NFA) 0.1 mM 4 hours prior to aPL.

Western Blot: HAEC were lysed in RIPA buffer (Abcam) and a cocktail of proteases inhibitors were added (Complete Ultra tablets EDTA free from Roche). The primary antibodies used were anti MYD88 (Abcam AB2064), Anti TF (Abcam AB151748) and anti VCAM-1 antibodies (Santa cruz-sc 8304).

Thrombin generation assay: Cells were cultured in 96-well plates and allowed to adhere at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO_2 . At 90% confluence, cells were incubated for 4 hours with different concentrations of aPL, aPL + HCQ or NS-IgG. Culture mediums were removed and 80 μl PPP was added to each well. Thrombin generation was initiated with 1 pM or 5 pM TF and 4 μM aPL. Thrombin generation was performed the same day for each condition, in order to reduce the variation of thrombin generation due to variable confluence.

Flow cytometry: HAEC were incubated with aPL for 4 hours, after which staining was performed with PE/Cy7 anti-human CD141 (thrombomodulin clone 80 BioLegend). Cohesive cells were incubated with acutase.

Data analysis. All results are expressed as mean \pm SEM. In all *in vitro* experiments, n represents the number of animals from which the arteries were taken (5 to 8 mice). For

quantitative variables, i.e. ETP, peak thrombin, VCAM-1, E-selectin expression, data were analyzed by ANOVA followed when significant by a Tukey post hoc test. Contractile responses are expressed in millinewtons (mN) and normalized to vessel length (mN/mm), and relaxing responses are expressed as percentage of reversal of the contractions induced by phenylephrine. ANOVA for repeated measures was used to determine the concentration–response curves and in the study of the carotid blood flow. Difference between groups was analysed by a Student t-test when appropriate. Data were analyzed using Prism 5.0 from Graph Pad Software. A P value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

aPL-induced prothrombotic state and inflammation is reversed by HCQ

In mesenteric arteries, aPL mice had a larger clot to arterial surface ratio, compared to control (aPL $33.53 \pm 5.78\%$ vs. control $10.3 \pm 2.90\%$; $P < 0.01$), (Fig 1A and 1B). HCQ significantly reduced mesenteric thrombosis (aPL-HCQ $10.53 \pm 3.08\%$; $P < 0.01$ vs. aPL).

In the carotid thrombosis model (Fig 1C), carotid flow rapidly decreased more rapidly in the aPL group, compared to control ($P < 0.05$), while no occlusion appeared after 30 min of follow-up in the aPL-HCQ group. ($P < 0.001$).

Western blot analysis showed that untreated aPL mice displayed a marked increase in TF levels compared to controls (aPL 0.63 ± 0.07 ; control 0.32 ± 0.03 ; $P < 0.01$) and this was reduced by HCQ (aPL-HCQ 0.42 ± 0.26 ; $P < 0.05$ vs. aPL) (Fig 2E). Furthermore, when compared to control, TF mRNA expression tended to increase in aPL mice (aPL 1.29 ± 0.19 ; control 0.90 ± 0.19 ; $P = 0.21$) while HCQ reduced this expression (0.86 ± 0.09 ; $P = 0.048$ vs. aPL) (Fig 2F). Finally, TF expression increased in HAECs after 2h exposure to aPL (supplemental data), and this was significant after 4h (aPL 0.33 ± 0.04 ; control 0.18 ± 0.04 ; $P < 0.05$). HCQ significantly decreased TF expression, that returned to baseline values (aPL-HCQ 0.14 ± 0.01 ; $P < 0.01$ vs. aPL) (Fig 3D). The endosomal NADPH oxidase inhibitor NFA (0.1mM), reduced TF expression that returned to baseline values suggesting that the polyclonal antibodies used were activating the NADPH oxidase pathway (aPL-NFA 0.19 ± 0.02 $P < 0.05$ vs. aPL), (Fig 3D).

Results with assessment of thrombin generation in mice are shown in Fig 2. aPL mice displayed a significant increase in ETP (aPL: 237.40 ± 23.78 ; control: 116.3 ± 14.81 $P < 0.01$) and peak thrombin generation (aPL 45.23 ± 5.67 ; control 21.88 ± 1.57 $P < 0.01$). HCQ induced a significant decrease in ETP (146 ± 11 $P < 0.05$ vs. aPL) and peak (23.89 ± 3.10 $P < 0.05$ vs. aPL) suggesting a reduced procoagulant state.

Results on thrombin generation test in endothelial cells HAEC are shown in Fig 3. Compared to control, aPL significantly increased ETP (aPL 683.40 ± 74.11 ; control 326.50 ± 45.82 ; $P < 0.01$) and peak thrombin (aPL 48.52 ± 4.11 ; control 27.37 ± 2.36 ; $P < 0.01$). HCQ markedly decreased both ETP (aPL-HCQ 367.00 ± 29.45 ; $P < 0.01$ vs. aPL) and peak thrombin generation (aPL-HCQ 29.61 ± 2.86 ; $P < 0.01$ vs. aPL).

Finally, as we used a high concentration of TF to trigger thrombin generation, we investigated the surface expression of thrombomodulin on HAEC, in order to explain the excess of ETP (Fig 3E). aPL significantly decreased TM expression (aPL 39.68 ± 0.35 ; control 52.30 ± 0.40 ; $P < 0.001$), and this was reversed by HCQ significantly improved the TM expression (aPL-HCQ 44.63 ± 0.37 ; $P < 0.001$ vs aPL.).

aPL-induced endothelial dysfunction is reversed by HCQ

We first studied endothelial function by measuring the relaxation induced by increasing concentrations of acetylcholine (10^{-9} to 3.10^{-5} M) in mouse mesenteric arteries (Fig 4A). In untreated mice, aPL reduced the responses to acetylcholine compared to control and NSig

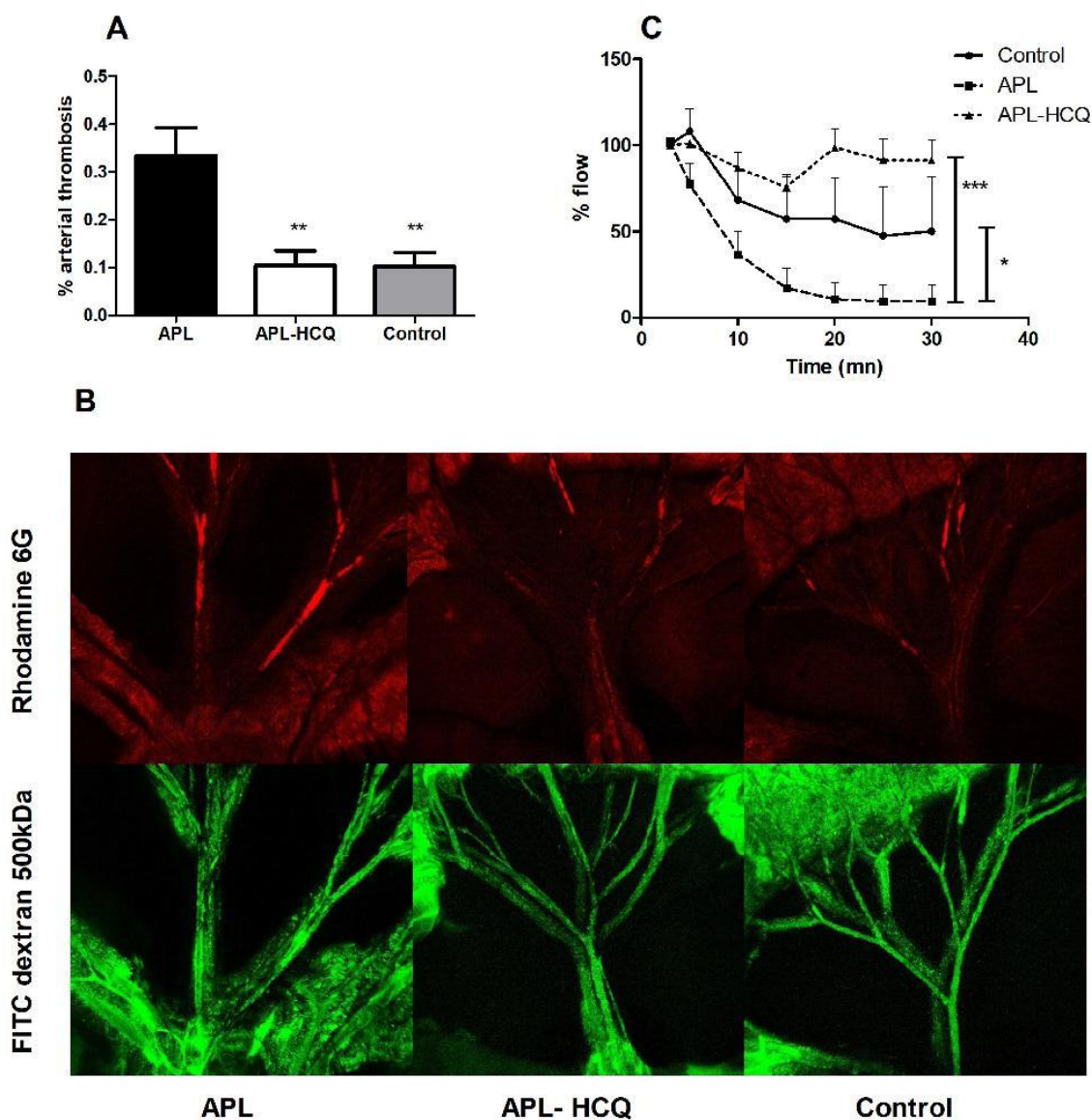


Fig 1. Effects of Hydroxychloroquine (HCQ) on in vivo thrombosis. (A) The thrombosis/arterial area ratio in control mice, or aPL mice either untreated or treated with HCQ, 30min after chemical injury (FeCl₃ 10%). (B) thrombosis was assessed with macroconfocal imaging. Platelets were labeled with rhodamine6G (red) and total arterial area was labeled with FITC-dextran 500kDa FITC (green) (n = 5). (C) Carotid blood flow (n = 6) measured with a flow probe in mice before and 30 min after FeCl₃ injury. Values are mean±SEM *: P<0.05; **: P<0.01 ***: P<0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212614.g001>

(control 99±1%; NSig 97±0.2%; APS 47±6%; *P*<0.001) while responses to SNP were similar in all groups (Fig 4D). This demonstrates that aPL induces severe endothelial dysfunction in untreated mice.

In aPL mice, HCQ induced a significant improvement in the relaxing response to acetylcholine, as compared to untreated mice (aPL-HCQ 96±1%; *P*<0.001 vs. aPL). Indeed, the

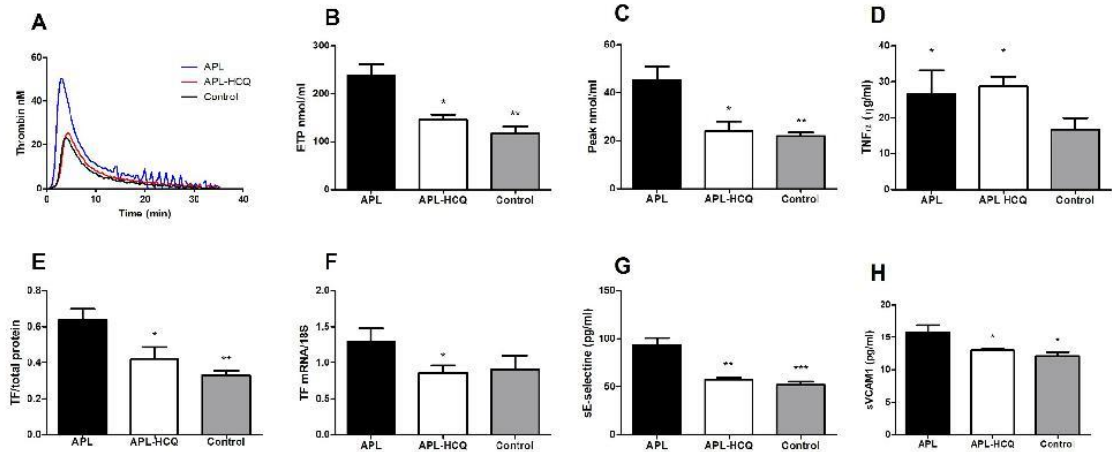


Fig 2. Effects of aPL and HCQ on procoagulant and inflammatory properties in mice. (A) Thrombin generation curves, (B) endogenous thrombin potential, (C) peak thrombin measured by calibrated automated thrombography (CAT) in the presence of Activated C protein (APC), (D) Plasma levels of TNF α , (E) carotid Tissue Factor expression assessed by western blotting and (F) aortic TF mRNA expression assessed by RT-PCR. (G) Plasma levels of sE-selectin, and (H) sVCAM-1 assessed by ELISA. Values are mean \pm SEM *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$; n = 5 / group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212614.g002>

relaxations to acetylcholine in HCQ-treated aPL mice were not significantly different from those of control and NSIg (Fig 4B). Furthermore, HCQ did not affect the response to ACH

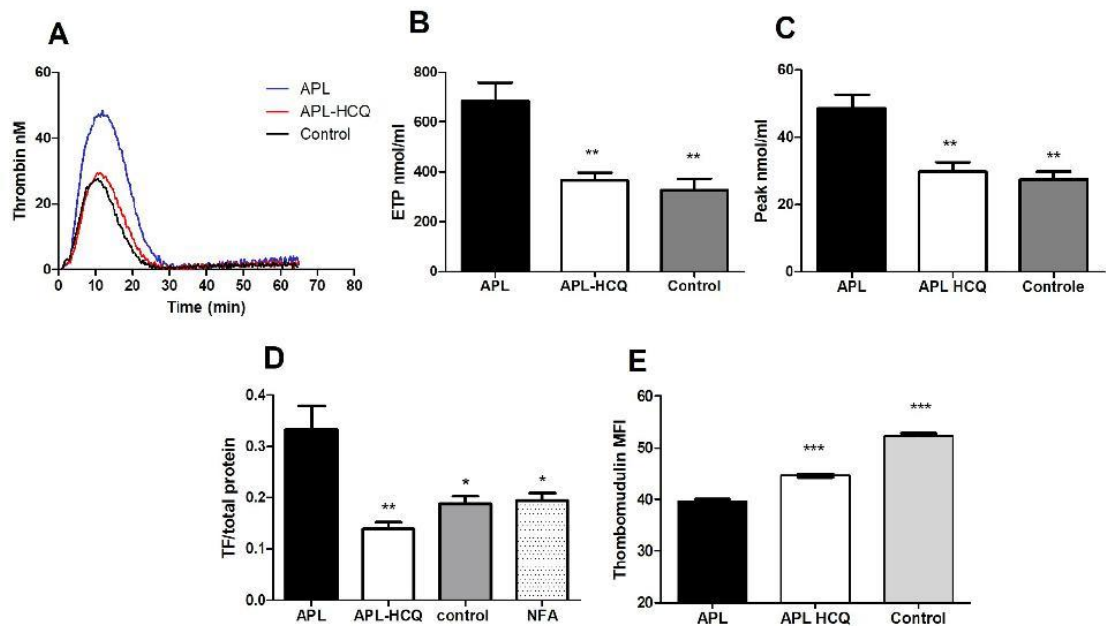


Fig 3. Effects of HCQ on procoagulant and inflammatory properties in endothelial cells. (A) Thrombin generation curves, (B) endogenous thrombin potential, and (C) peak thrombin measured in the presence of Activated C protein (APC) by calibrated automated thrombography (CAT) in HAEC. (D) Tissue factor expression measured in HAEC with or without nilfiumic acid 0.1mM by western blotting (E) Thrombomodulin quantified by flow cytometry assay, expressed in mean fluorescence intensity. (MFI) Values are mean \pm SEM *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$; n = 5 / group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212614.g003>

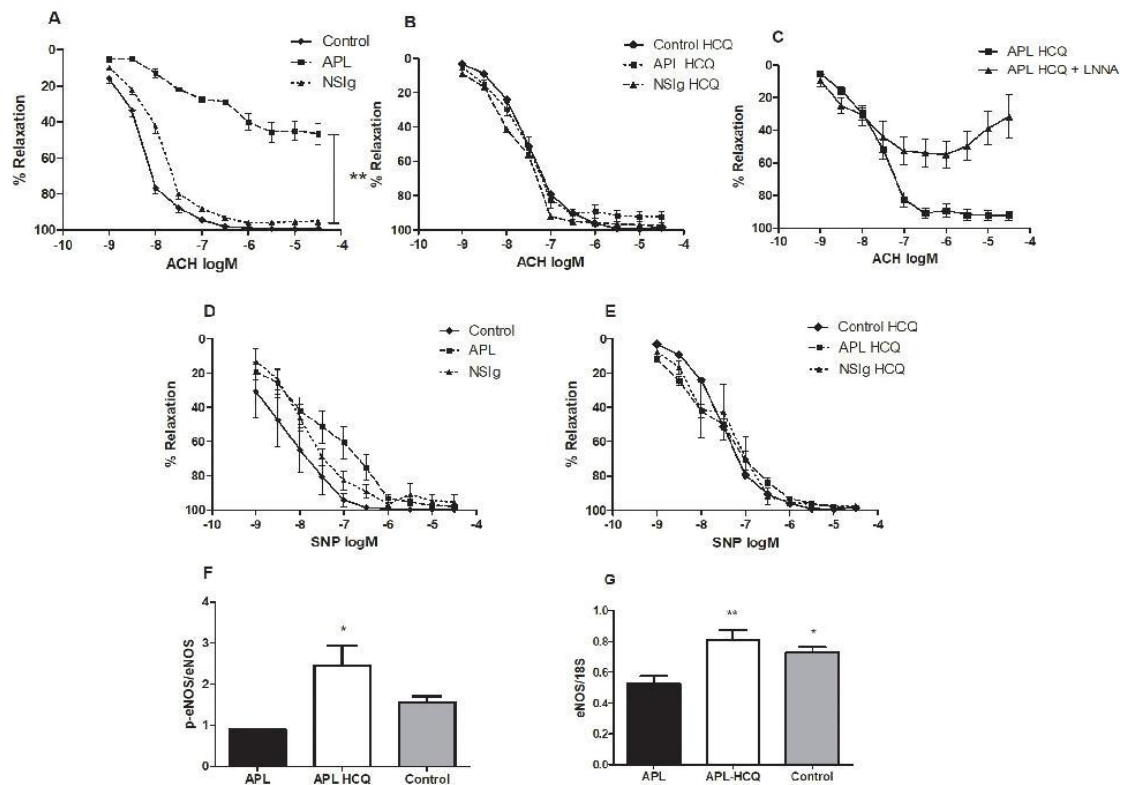


Fig 4. Effect of antiphospholipid antibodies and hydroxychloroquine on the relaxing responses to acetylcholine and on eNOS. (A,D) Endothelial function of mesenteric arteries was assessed seven days after the injection in control animals (full lines) and in aPL-IgG mice either untreated (dotted lines) or treated with HCQ (dashed lines) Relaxation responses to ACH and SNP in untreated mice or (B,E) HCQ-treated mice. (C) Effect of LNNA in the relaxing response to ACH. (F) Mouse mesenteric artery ratio of P-eNOS/eNOS measured by western blot. (G) Mouse aortic eNOS mRNA expression. Values are mean±SEM *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$; n = 8 by groups in relaxation and ELISA experiments, n = 4 in western blot and qRT-PCR assays.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212614.g004>

and SNP in control mice (Fig 4B and 4E). The relaxing response in treated mice was markedly reduced by the NO synthase (NOS) inhibitor L-NNA (10^{-4} M) demonstrating that the improvement in relaxation induced by HCQ is largely due to an increased NO-mediated relaxation (Fig 4C). Previous studies have demonstrated that aPL-induced endothelial dysfunction was mediated by inhibition of eNOS activation [17] and mRNA expression [11]. To determine whether hydroxychloroquine normalize eNOS activation we measured the P-eNOS/eNOS ratio (Fig 4F) and eNOS mRNA expression (Fig 4G) in mesenteric arteries and aortas in mice. HCQ induced a significant increase in P-eNOS/eNOS ratio (aPL 0.87 ± 0.08 ; aPL-HCQ 2.46 ± 0.47 $P = 0.038$) and in eNOS mRNA expression (aPL 0.53 ± 0.05 ; aPL-HCQ 0.73 ± 0.03).

In addition to the assessment of the vascular function, we measured the effect of HCQ on inflammatory biomarkers. Compared to control, aPL mice displayed a marked increase in soluble levels of VCAM-1 (control 12.08 ± 0.64 , aPL 15.81 ± 1.04 ; $P < 0.01$) and E-selectin (control 51.58 ± 4.00 ; aPL 93.05 ± 7.58 ; $P < 0.001$; Fig 2G and 2H). In contrast, when compared to untreated mice, HCQ induced a significant drop in levels of sVCAM-1 (aPL-HCQ 12.99 ± 0.29 ; $P < 0.05$ vs. aPL) and sE-selectin (APL-HCQ 57.70 ± 1.81 ; $P < 0.01$ vs. aPL). Finally, aPL

increased plasma TNF α (aPL26.60 \pm 6.54; Control 16.65 \pm 3.26; $P < 0.01$), however this was not affected by HCQ (aPL-HCQ 28.75 \pm 2.65).

Discussion

The present study demonstrates the beneficial effects of HCQ on thrombotic status in APS, evidenced by reduced clot formation and thrombin generation in both a mouse model and in human endothelial cells. One most likely mechanism for these beneficial effects is the improvement of endothelial function (restored NO production), associated with correction of the pro-inflammatory phenotype observed both *in vivo* and *in vitro*.

Although APS is primarily characterized by thrombosis and obstetric morbidities [1], its prothrombotic status has rarely been addressed. Several studies reported increased monocyte TF expression in APS patients [18–20]. A few *in vitro* experiments also support a key role for aPL in the induction of TF expression [21–24], as confirmed in the present study. The expression of TF by HAEC increased after 2 hours and was significant after 4 hours incubation with aPL. This incubation time has previously been reported by Pierangeli *et al* in HUVEC [25]. More recently, Muller-Calleja *et al.* found that the time course of TNF α release by monocyte was dependent on the type of aPL. Indeed, TNF α release by MonoMac cells in the presence of HL5B and J7G aPL was maximum between 3 and 6 hours. Our results are also consistent with those of Prinz *et al.* showing that HL5b antibodies induced endothelial TF mRNA expression starting at 2 hours and peaking at 4 hours [26]. Since TF triggers the extrinsic pathway of the coagulation cascade leading to the production of thrombin, we then assessed aPL-induced thrombin generation. Therefore, the significant increase in ETP and peak thrombin generation in mice is consistent with the changes in TF and appears more pathologically relevant, since the thrombin generation test evaluates the overall activation and inhibition of haemostasis [27]. Indeed, some reports suggest that detection of an altered thrombin generation under *in vitro* conditions might closely mimic what occurs *in vivo* and then provide a good estimation of the total coagulation potential, compared to traditional coagulation tests [28]. Our results are in line with clinical studies describing an association between an unbalanced thrombin generation and thrombotic risk in APS [29–31].

In addition, since a recent study suggests that the prothrombotic effect of anti- β 2GPI antibodies involves both the expression of TF and TM in endothelial cells [32], we assessed thrombomodulin expression in HAEC to determine whether aPL increase ETP and peak thrombin generation test despite a high concentration of TF in our experiments. Thus, the decreased expression of TM after exposure to aPL that is partially reversed by HCQ confirms its important role in the thrombin generation in APS and suggests a potential mechanism by which HCQ prevents thrombosis. This is confirmed by the results in the *in vivo* models of thrombosis, where HCQ reversed FeCl₃-mediated thrombosis. Therefore, we demonstrated that HCQ improves the TF expression, thrombin generation and *in vivo* thrombosis. Edwards *et al.* previously found that the thrombotic profile was improved in APS mice treated with HCQ [33]. Recently, the results of an open-label study confirmed in patients receiving HCQ for 3 months a reduction in soluble TF levels, suggesting an antithrombotic effect. However, they failed to show any effect on thromboelastography [15]. Therefore, to date the effects of HCQ on the thrombin generation test have not been reported in clinical studies. Indeed, Cohen *et al.* in the RAPS study, were unsuccessful to use thrombin generation as primary endpoint to investigate the efficacy of an antithrombotic treatment [34].

Because endothelial dysfunction is a well-recognized contributor of the procoagulant status in APS, we investigated the endothelial effect of HCQ [7]. This dysfunction is directly mediated by aPL, as demonstrated by transfer experiments in cell cultures [25] and in mice [11].

Herein, our experiments confirm that aPL induce an endothelial dysfunction as demonstrated both by the overexpression of adhesion molecule VCAM and E selectin and the altered endothelium dependent relaxation to acetylcholine. The results of the inhibitory effect on vascular relaxation by L-NNA confirmed the central role of NO in the aPL-induced endothelial dysfunction and its improvement by HCQ. This hypothesis is also supported by the observed decrease in an index of NOS activation (mesenteric phosphorylated S1177 eNOS/eNOS ratio) in APL mice that is reversed by HCQ. Recently preclinical studies indicated that APS-related thrombosis was due to eNOS inhibition via apolipoprotein E receptor 2 (apoER2)-dependent processes. Some reports demonstrated that, in endothelial cells and in mice, aPL activates the protein phosphatase 2A (PP2A) leading to a dephosphorylation of S1179 (S1179 in bovine cells, S1177 in human) and finally to decreased NO production [17,35].

Recently, a study demonstrated that HCQ may interfere with the TNF α pathway in endothelial cells directly exposed to this cytokine [36]. We previously reported that vascular dysfunction in APS was largely mediated by TNF α since treatment with infliximab improved endothelial function through modulation of the NO pathway. We can assume that the effect of HCQ is partially secondary to its anti TNF α properties. However, we previously failed to demonstrate an effect of infliximab on eNOS mRNA levels [11]. In this study, HCQ significantly improved eNOS mRNA expression and protein content, suggesting that it may stimulate transcription or posttranscriptional regulation of eNOS expression.

Our results should be analyzed in regard to the recent publication of Müller et al. who showed that the signaling pathway of aPL was epitope-dependent. It is interesting to note that HCQ affected only the anticardiolipin antibody (HL5b) which is cofactor-independent as well as the one that recognizes both cardiolipin and B2GP1 (J7G).

The possible role of NADPH oxidase inhibition in the antithrombotic effects of HCQ has been demonstrated previously [37]. In our study, we have also found that NFA, an endosomal NADPH inhibitor, prevented aPL-induced TF overexpression in HAEC [38], suggesting that NADPH oxidase is the cornerstone of endothelial dysfunction mediated by aPL, and of the protective effect of HCQ.

One potential limit of our study is that it used a preparation containing different subpopulations of aPL however, the used of pathogenic aPL may closely represent the clinical setting, where most APS patients have more than one aPL species.

Conclusion

The present study demonstrates the beneficial effect of HCQ on the prothrombotic state, most likely related to the improvement of endothelial function. Potential mechanisms include improvement of thrombomodulin expression and restored eNOS activation via inhibition of endosomal NADPH oxidase. Therefore, HCQ may be of special relevance in clinical practice and, this hypothesis warrants evaluation. In this regard, we are currently conducting a randomized controlled trial (APLAQUINE) that investigates whether treatment with HCQ modulates vascular endothelial function and coagulation parameters in patients with APS (NCT02595346).

Acknowledgments

The authors would like to thank JP Henry, N Perzo, S. Renet, A. Dumesnil, (Inserm U1096, Rouen, France) for technical assistance. Authors also thank Dr V. Regnault (Inserm U1116 Nancy, France) who graciously gave activated protein C.

Author Contributions

Conceptualization: Sébastien Miranda, Maelle Le Besnerais, Ludovic Galas, Hervé Levesque, Vincent Richard, Ygal Benhamou.

Data curation: Véronique Le Cam-Duchez.

Formal analysis: Sébastien Miranda, Paul Billoir, Fabienne Jouen.

Investigation: Sébastien Miranda, Louise Damian, Damien Schapman, Ludovic Galas.

Methodology: Sébastien Miranda, Pierre Alain Thiebaut.

Supervision: Vincent Richard, Ygal Benhamou.

Validation: Sébastien Miranda, Paul Billoir, Hervé Levesque, Robinson Joannides, Vincent Richard, Ygal Benhamou.

Visualization: Sébastien Miranda, Paul Billoir, Louise Damian, Damien Schapman.

Writing – original draft: Sébastien Miranda.

Writing – review & editing: Vincent Richard, Ygal Benhamou.

References

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006; 4: 295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x> PMID: 16420554
2. López-Pedreira C, Buendía P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aguirre MA, Barbarroja N, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 301–311. <https://doi.org/10.1002/art.21549> PMID: 16385547
3. Kinev AV, Roubey RAS. Tissue factor in the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2008; 17: 952–958. <https://doi.org/10.1177/0961203308096662> PMID: 18827061
4. Ahmed K, Vianna JL, Khamashta MA, Hughes GR. IL-2, IL-6 and TNF levels in primary antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1992; 10: 503. PMID: 1458705
5. Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Harris EN. Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin. *Circ Res*. 2001; 88: 245–250. PMID: 11157679
6. Kaplanski G, Cacoub P, Farnarier C, Marin V, Grégoire R, Gatel A, et al. Increased soluble vascular cell adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus-related antiphospholipid syndrome: correlations with the severity of thrombosis. *Arthritis Rheum*. 2000; 43: 55–64. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200001\)43:1<55::AID-ANR8>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200001)43:1<55::AID-ANR8>3.0.CO;2-M) PMID: 10643700
7. Benhamou Y, Bellien J, Armengol G, Brakenhielm E, Adriouch S, Iacob M, et al. Role of toll-like receptors 2 and 4 in mediating endothelial dysfunction and arterial remodeling in primary arterial antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2014;
8. Charakida M, Besler C, Batuca JR, Sangle S, Marques S, Sousa M, et al. Vascular abnormalities, para-oxonase activity, and dysfunctional HDL in primary antiphospholipid syndrome. *JAMA J Am Med Assoc*. 2009; 302: 1210–1217.
9. Mercanoglu F, Erdogan D, Oflaz H, Kücükaya R, Selcukbiricik F, Gül A, et al. Impaired brachial endothelial function in patients with primary anti-phospholipid syndrome. *Int J Clin Pract*. 2004; 58: 1003–1007. PMID: 15605661
10. Tanne D, Katzav A, Beilin O, Grigoriadis NC, Blank M, Pick CG, et al. Interaction of inflammation, thrombosis, aspirin and enoxaparin in CNS experimental antiphospholipid syndrome. *Neurobiol Dis*. 2008; 30: 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.12.004> PMID: 18308578
11. Benhamou Y, Miranda S, Armengol G, Harouki N, Drouot L, Zahr N, et al. Infliximab improves endothelial dysfunction in a mouse model of antiphospholipid syndrome: role of reduced oxidative stress. *Vascul Pharmacol*. 2015; 71: 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.014> PMID: 25869505

12. Schmidt-Tanguy A, Voswinkel J, Henrion D, Subra JF, Loufrani L, Rohmer V, et al. Antithrombotic effects of hydroxychloroquine in primary antiphospholipid syndrome patients. *J Thromb Haemost JTH*. 2013; 11: 1927–1929. <https://doi.org/10.1111/jth.12363> PMID: 23902281
13. Espinola RG, Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN, Ghara AE. Hydroxychloroquine reverses platelet activation induced by human IgG antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*. 2002; 87: 518–522. PMID: 11916085
14. Rand JH, Wu X-X, Quinn AS, Ashton AW, Chen PP, Hathcock JJ, et al. Hydroxychloroquine protects the annexin A5 anticoagulant shield from disruption by antiphospholipid antibodies: evidence for a novel effect for an old antimalarial drug. *Blood*. 2010; 115: 2292–2299. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-213520> PMID: 19965621
15. Schreiber K, Breen K, Parmar K, Rand JH, Wu X-X, Hunt BJ. The effect of hydroxychloroquine on haemostasis, complement, inflammation and angiogenesis in patients with antiphospholipid antibodies. *Rheumatol Oxf Engl*. 2018; 57: 120–124.
16. Billoir P, Miranda S, Damian L, Richard V, Benhamou Y, Duchez VLC. Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: Evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies. *Thromb Res*. 2018; 169: 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.07.021> PMID: 30031291
17. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, Thomas GD, Yuhanna IS, Girardi G, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via β 2GPI and apoER2. *J Clin Invest*. 2011; 121: 120–131. <https://doi.org/10.1172/JCI39828> PMID: 21123944
18. Reverter JC, Tàssies D, Font J, Monteagudo J, Escolar G, Ingelmo M, et al. Hypercoagulable state in patients with antiphospholipid syndrome is related to high induced tissue factor expression on monocytes and to low free protein s. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 1319–1326. PMID: 8911269
19. Cuadrado MJ, López-Pedraza C, Khamashta MA, Camps MT, Tinahones F, Torres A, et al. Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: a pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum*. 1997; 40: 834–841. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199705\)40:5<834::AID-ART8>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199705)40:5<834::AID-ART8>3.0.CO;2-#) PMID: 9153543
20. Dobado-Berrios PM, López-Pedraza C, Velasco F, Aguirre MA, Torres A, Cuadrado MJ. Increased levels of tissue factor mRNA in mononuclear blood cells of patients with primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 1999; 82: 1578–1582. PMID: 10613637
21. Kornberg A, Blank M, Kaufman S, Shoenfeld Y. Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anti-cardiolipin antibodies. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1994; 153: 1328–1332.
22. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 1998; 79: 276–281. PMID: 9493575
23. Reverter JC, Tàssies D, Font J, Khamashta MA, Ichikawa K, Cervera R, et al. Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum*. 1998; 41: 1420–1427. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199808\)41:8<1420::AID-ART11>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199808)41:8<1420::AID-ART11>3.0.CO;2-U) PMID: 9704640
24. Zhou H, Wolberg AS, Roubey RAS. Characterization of monocyte tissue factor activity induced by IgG antiphospholipid antibodies and inhibition by dilaazep. *Blood*. 2004; 104: 2353–2358. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0145> PMID: 15226179
25. Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation*. 1999; 99: 1997–2002. PMID: 10209004
26. Prinz N, Clemens N, Canisius A, Lackner KJ. Endosomal NADPH-oxidase is critical for induction of the tissue factor gene in monocytes and endothelial cells. Lessons from the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2013; 109: 525–531. <https://doi.org/10.1160/TH12-06-0421> PMID: 23328933
27. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*. 2006; 96: 553–561. PMID: 17080210
28. Van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol*. 2008; 142: 889–903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07267.x> PMID: 18564356
29. Dienava-Verdoold I, Boon-Spijker MG, de Groot PG, Brinkman HJM, Voorberg J, Mertens K, et al. Patient-derived monoclonal antibodies directed towards beta2 glycoprotein-1 display lupus anticoagulant activity. *J Thromb Haemost JTH*. 2011; 9: 738–747. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04212.x> PMID: 21255251

30. Regnault V, Béguin S, Wahl D, de Maistre E, Coenraad Hemker H, Lecompte T. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost.* 2003; 89: 208–212. PMID: [12574797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12574797/)
31. Efthymiou M, Lawrie AS, Mackie I, Arachchillage D, Lane PJ, Machin S, et al. Thrombin generation and factor X assays for the assessment of warfarin anticoagulation in thrombotic antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* 2015; 135: 1191–1197. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.03.030> PMID: [25895847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25895847/)
32. Rikarni null, Dharma R, Tambunan KL, Isbagyo H, Dewi BE, Acang N, et al. Prothrombotic Effect of Anti-beta-2 Glycoprotein-1 Antibodies on the Expression of Tissue Factor, Thrombomodulin, and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Endothelial Cells. *Acta Medica Indones.* 2015; 47: 31–37.
33. Edwards MH, Pierangeli S, Liu X, Barker JH, Anderson G, Harris EN. Hydroxychloroquine reverses thrombogenic properties of antiphospholipid antibodies in mice. *Circulation.* 1997; 96: 4380–4384. PMID: [9416907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9416907/)
34. Cohen H, Hunt BJ, Efthymiou M, Arachchillage DRJ, Mackie IJ, Clawson S, et al. Rivaroxaban versus warfarin to treat patients with thrombotic antiphospholipid syndrome, with or without systemic lupus erythematosus (RAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 2/3, non-inferiority trial. *Lancet Haematol.* 2016; 3: e426–436. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(16\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(16)30079-5) PMID: [27570089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27570089/)
35. Sacharidou A, Chambliss KL, Ulrich V, Salmon JE, Shen Y-M, Herz J, et al. Antiphospholipid antibodies induce thrombosis by PP2A activation via apoER2-Dab2-SHC1 complex formation in endothelium. *Blood.* 2018; 131: 2097–2110. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-814681> PMID: [29500169](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29500169/)
36. Li R, Lin H, Ye Y, Xiao Y, Xu S, Wang J, et al. Attenuation of antimalarial agent hydroxychloroquine on TNF- α -induced endothelial inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2018; 63: 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.08.008> PMID: [30121047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30121047/)
37. Müller-Calleja N, Manukyan D, Canisius A, Strand D, Lackner KJ. Hydroxychloroquine inhibits proinflammatory signalling pathways by targeting endosomal NADPH oxidase. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76: 891–897. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210012> PMID: [27903507](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27903507/)
38. Müller-Calleja N, Hollerbach A, Häuser F, Canisius A, Orning C, Lackner KJ. Antiphospholipid antibody-induced cellular responses depend on epitope specificity: implications for treatment of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 15: 2367–2376. <https://doi.org/10.1111/jth.13865> PMID: [29024318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29024318/)

Manuscrit numéro 4

Ce quatrième travail a évalué le test de génération de thrombine chez différents types de SAPL.

Nous avons inclus rétrospectivement 41 patients avec les critères de classification de Sydney (SAPL thrombotique, SAPL obstétrical) et avec la persistance d'aPL sans évènement clinique (SAPL biologique). Le test de génération de thrombine a été effectué sur plasma pauvre en plaquettes (PPP). La résistance à la protéine C activée a été mesurée par le TGT chez les patients.

Les SAPL thrombotique et obstétricaux ont une augmentation de la production globale de thrombine (ETP_{control}=808 nM.min [756-853] contre 1265 nM.min [956-1741] et 1863 nM.min [1434-2080] respectivement) (Peak_{control}=78 nM [74-86] contre 153 nM [109-215] et 254 nM.min [232-289] respectivement). Le SAPL biologique n'a connu qu'une augmentation du temps de latence (T_{control}=4,89±1,65 min contre 13,6±3,9 min). Cette augmentation du temps de latence représente l'action des aPL, qui se lient aux PL présents dans le réactif du TGT (comme ce qui est observé avec l'allongement du TCA des patients SAPL). Une augmentation de l'aPCR a été observée dans le groupe SAPL thrombotique (52,7±16,4%) et SAPL obstétricaux (64,1±14,6%) par rapport au groupe de contrôle (27,2±13,8%).

Ces résultats suggèrent un état hypercoagulable chez les patients SAPL sans traitement anticoagulant. Une donnée jamais décrite dans la littérature est l'état hypercoagulable dans patientes souffrant d'un SAPL obstétrical. Il est normalement peu décrit de thrombose dans le SAPL obstétrical. Le risque de développer un évènement thrombotique secondaire à un SAPL obstétrical a été démontré dans une étude prospective (319), et récemment, dans une étude rétrospective avec 63% de patientes qui ont fait une TVP dans les 7.6 années du post-partum (320). Nos résultats biologiques confirment les données de la littérature, à savoir un état d'hypercoagulabilité plus important à l'état basal (en dehors de la grossesse) dans le groupe SAPL obstétrical et de fait un sur-risque de maladie thromboembolique.

De nombreuses études se focalisent sur le traitement du SAPL soit avec des antithrombotiques en prévention secondaire voire primaire ; soit avec de nouvelles thérapeutiques additionnelles tels que l'hydroxychloroquine (321) (139) ou la rapamycine (322). Ces différents traitements sont instaurés lors de SAPL secondaire à un LES, de manifestations de récives thrombotiques ou dans le cadre de greffe rénale (323). Le global APS score (GAPSS) serait un moyen de prédire le risque thrombotique ou les morbidités obstétricales (324), et permettrait d'évaluer la nécessité de mise en place d'une thérapeutique supplémentaire. Cependant, ce score manque de sensibilité et il inclut la recherche des anticorps anti-prothrombine/phosphatidylsérine non réalisé en pratique courante. Par ailleurs bien que

ce score semble identifier un sous-groupe de patients à risque, il n'a pas fait la preuve de son intérêt pour décider de la mise en route d'un traitement de prophylaxie primaire. L'utilisation d'un marqueur biologique de l'état pro-coagulant chez des patients indépendamment de leur profil immunologique pourrait améliorer l'évaluation du risque thrombotique ces patients.

La prévention primaire dans le SAPL biologique reste controversée. Le risque de développer un événement thrombotique est probablement inférieur à 1% par an, en l'absence de co-morbidité associée(323), et 5.3% si le SAPL est associé à une triple positivité, le sexe masculin et les facteurs de risques habituels de TVP (325). Le niveau de preuve reste faible sur l'utilisation de l'aspirine en prévention primaire (121) et les résultats d'une méta-analyse ont démontré qu'une prophylaxie dans les situations à risque serait plus adapté (326).

Les résultats de notre étude ont montré que les patients du groupe SAPL biologique n'avaient pas un état d'hypercoagulabilité avec une génération de thrombine identique à celle du groupe contrôle. Il existe seulement un allongement du temps de latence identique à celui retrouvé lors d'un allongement du TCA. Dans ce groupe, nous n'avons pas un nombre suffisant de patients ayant une triple positivité biologique pour évaluer un sur-risque thrombotique. Il serait sans doute intéressant d'évaluer le risque thrombotique, par le TGT, pour éventuellement stratifier d'une prévention primaire chez les SAPL biologiques.

De même dans notre étude, dans le groupe SAPL secondaire, seul un allongement du temps de latence est retrouvé alors que Pereira *et al.* avaient montré une augmentation de génération de thrombine dans le LES (289). Dans leur étude, 6 patients avaient un SAPL secondaire. Il n'y avait pas de différence entre les patients ayant un LES et les patients avec un SAPL secondaire. Cependant, leur étude a évalué la génération de thrombine secondaire aux microparticules pro-coagulantes. Nos résultats démontrent une augmentation non significative de génération de thrombine dans le SAPL secondaire. Dans notre étude, tous les patients avec un LES étaient traités par hydroxychloroquine. Rand *et al.* ont démontré une diminution de production de facteur tissulaire chez les patients SAPL sous antipaludéen de synthèse (327). Une étude sur un modèle de cellules endothéliales de SAPL a démontré qu'il y avait une augmentation de génération de thrombine (328), et des résultats préliminaires ont démontré qu'une incubation supplémentaire d'hydroxychloroquine normalisait la génération de thrombine (résultats non publiés). Ainsi, le traitement par hydroxychloroquine pourrait expliquer l'absence de différence entre le groupe contrôle et les SAPL secondaires.

La RPCa est connue pour augmenter le risque de thrombose veineuse dans le SAPL d'un odd ratio de 3.31 (1.30-8.41) (329). Cette RPCa a été mise en évidence par le test de génération de thrombine sur plasma riche en plaquettes (330). Une étude de Zuily *et al.* a confirmé que la mise en évidence d'une

RPCa dans le SAPL par TGT, en analyse univariée, était un facteur de risque de développer une thrombose veineuse superficielle (331). La thrombose veineuse superficielle n'est pas considérée comme un critère clinique du SAPL selon les recommandations proposées lors du 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (332).

Le suivi de la cohorte Europhospholipid a démontré une récurrence thrombotique chez 16 % des patients (333). Cette récurrence avait lieu chez des patients qui étaient sous traitement anticoagulant ou non. Dans notre étude, deux patients qui n'étaient pas sous traitement anticoagulant ont eu une récurrence de thrombose l'année qui a suivi le TGT. Chez ces derniers, les paramètres du TGT étaient augmentés au moment de l'étude. Des études ont été faites sur le TGT et la récurrence de thrombose chez des patients sans thrombophilie constitutionnelle ou acquise après arrêt de traitement par anticoagulant par Hron *et al.* (334) et par Chaireti *et al.* (335). Les résultats sont contradictoires entre les deux études, Hron *et al.* démontrait qu'un pic de thrombine augmenté était associé à un risque de récurrence de 20% à 4 ans alors que Chaireti *et al.* ont retrouvé des résultats opposés (pic de thrombine plus faible associé à une récurrence). Les conditions analytiques dans ces études n'étant pas les mêmes, il est difficile de les comparer. Une étude chez les patients SAPL serait intéressante pour évaluer le risque de récurrence.

Article

Hypercoagulability Evaluation in Antiphospholipid Syndrome without Anticoagulation Treatment with Thrombin Generation Assay: A Preliminary Study

Paul Billoir ^{1,*}, Sébastien Miranda ², Herve Levesque ², Ygal Benhamou ² and Véronique Le Cam Duchez ¹

¹ Vascular Hemostasis Unit, Rouen University Hospital, Normandie University, UNIROUEN, INSERM U1096, F 76000 Rouen, France; veronique.le-cam@chu-rouen.fr

² Vascular and Thrombosis Unit, Department of Internal Medicine, Rouen University Hospital, Normandie University, UNIROUEN, INSERM U1096, F 76000 Rouen, France; sebastien.miranda@chu-rouen.fr (S.M.); herve.levesque@chu-rouen.fr (H.L.); ygal.benhamou@chu-rouen.fr (Y.B.)

* Correspondence: paul.billoir@chu-rouen.fr; Tel.: +33-23-28-88-129; Fax: +33-23-28-80-951



Citation: Billoir, P.; Miranda, S.; Levesque, H.; Benhamou, Y.; Le Cam Duchez, V. Hypercoagulability Evaluation in Antiphospholipid Syndrome without Anticoagulation Treatment with Thrombin Generation Assay: A Preliminary Study. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2728. <https://doi.org/10.3390/jcm10122728>

Academic Editor: Maria Efthymiou

Received: 14 May 2021

Accepted: 18 June 2021

Published: 21 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Antiphospholipid syndrome (APS) is associated with thrombotic events (tAPS) and/or obstetrical morbidity (oAPS), with persisting antiphospholipid antibodies (aPL). Despite an update of aPL in 2006, several patients had typical clinical events without the classical biological criteria. The aim of our study was to evaluate the hypercoagulability state with both thrombin generation (TG) profiles and activated protein C resistance (aPCR) in different types of APS. Methods: We retrospectively included 41 patients with Sydney criteria classification (tAPS, oAPS) and no clinical manifestation of APS with persistent aPL (biological APS). A thrombin generation assay was performed with a Fluoroskan Ascent fluorometer in platelet-poor plasma (PPP). Activated protein C resistance was measured as a ratio: $ETP_{+aPC}/ETP_{-aPC} \times 100$. Results: Thrombotic APS and oAPS had an increase of global thrombin generation ($ETP_{control} = 808 \text{ nM}\cdot\text{min}$ (756–853) vs. 1265 nM·min (956–1741) and 1863 nM·min (1434–2080), respectively) ($Peak_{control} = 78 \text{ nM}$ (74–86) vs. 153 nM (109–215) and 254 nM·min (232–289), respectively). Biological APS had only a lag time increase ($T_{control} = 4.89 \pm 1.65 \text{ min}$ vs. $13.6 \pm 3.9 \text{ min}$). An increased aPCR was observed in tAPS ($52.7 \pm 16.4\%$), oAPS ($64.1 \pm 14.6\%$) as compared to the control group ($27.2 \pm 13.8\%$). Conclusion: Our data suggest an increase of thrombin generation in thrombotic and obstetrical APS and no hypercoagulable states in patients with biological APS. The study of a prospective and a larger controlled cohort could determine the TGA useful for APS monitoring and could confirm an aPCR evaluation in PPP.

Keywords: antiphospholipid syndrome; thrombin generation assay; hypercoagulability; activated protein C resistance

1. Introduction

Antiphospholipid syndrome (APS) is associated with thrombotic events (tAPS) and/or obstetrical morbidity (oAPS), with persisting antiphospholipid antibodies (aPL) [1]. In tAPS, a thrombotic recurrence is observed in 16% of patients. Because of anticoagulant treatments, bleeding could also occur in APS. Then mortality is about 10% at 10 years [2]. APS could be primary or secondary to autoimmune diseases (principally systemic lupus erythematosus (SLE)) [3]. However, persisting aPL in autoimmune disease is not always associated with vascular injury and thrombotic events [4]. In addition, recently, a retrospective study demonstrated a thrombotic risk increased in oAPS [5].

Moreover, several patients, were considered as “asymptomatic” APS or biological APS (bAPS), with persisting aPL without clinical event. These patients had a global thrombotic risk equivalent to that of the general population [6]. However, no biomarkers have been

developed to evaluate the thrombotic risk of bAPS and possibly, to initiate primary thrombosis prevention. In humans, the hypercoagulability state can be evaluated with a thrombin generation assay (TGA) [7–9]. Antiphospholipid syndrome has already been evaluated by TGA. An increased lag time was observed in platelet-poor plasma (PPP) [10] and an activated protein C resistance (aPCR) in platelet-rich plasma (PRP) [10,11]. Moreover, aPL induced a hypercoagulability on endothelial cells demonstrated with TGA [12–14].

The aim of our study was to evaluate the hypercoagulability state in APS after a short discontinuation of anticoagulant with both thrombin generation (TG) profiles and activated protein C resistance (aPCR) in different types of APS.

2. Materials and Methods

We retrospectively included patients with Sydney criteria classification [15] (tAPS, oAPS) and no full criteria classification (bAPS)). Clinical data, biological results, treatment and clinical outcomes were retrieved from hospital medical records. tAPS patients who had transitory stop anticoagulant treatment were also included. Patients were considered as bAPS when an aPL positive test persisted for more than 12 weeks without clinical event. Antiphospholipid syndrome patients with congenital thrombophilia (antithrombin, protein C and S decrease, factor II and V Leiden mutation), inducing increased thrombin generation, were excluded. Patients with anticoagulant treatment, acute inflammatory syndrome, active neoplasm, or were pregnant, were excluded (TG modification). We compared to a control group of 25 healthy volunteers, without history of thrombosis.

The two different coagulation tests used to detect the lupus anticoagulant according to the International Society of Thrombosis and Hemostasis recommendations [16] were a sensitive activated partial thromboplastin time assay (PTT-LA, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France) and a phospholipid dependence assay with diluted Russell viper venom test (STA-sta clot DRVV screen and STAstac lot DRVV confirm, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France).

Anti-cardiolipin (aCL) and anti-b2GPI1 antibodies of IgM and IgG isotypes were detected in the serum by the routinely used ELISA methods: QUANTA lite IgM ACA III (Inova, WERFEN, Le Pré Saint Gervais, France) and QUANTA lite IgG ACA III (Inova, WERFEN, Le Pré Saint Gervais, France) for aCL IgM and IgG, respectively, and EliA b2-Glycoprotein I IgM (Phadia, Thermo scientific, Villebon sur Yvette, France) and EliA b2-Glycoprotein I IgG (Phadia, Thermo scientific, Villebon sur Yvette, France) for anti-b2GPI1 IgM and IgG, respectively.

Thrombin generation assay was performed with Fluoroskan Ascent fluorometer (Thermoscientific Lab systems, Helsinki, Finland). Thrombin generation (TG) was triggered by a low concentration of TF (1 pM) (PPP Low reagent, Diagnostica Stago, Asnières, France). For aPCR, 6.7 nM of activated protein C were added (gift from Dr V Régnauld, Université de Lorraine, INSERM, DCAC, F-54000 Nancy, France). Activated protein C resistance was measured as a ratio: $ETP_{+aPC} / ETP_{-aPC} \times 100$. All data were expressed as mean \pm SD or median \pm interquartile range. Data were analyzed with Graphpad Prism 5.0 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, United States) and with Excel 2016 (Microsoft, Albuquerque, NM, United States). One way ANOVA, Kruskal–Wallis test, and Dunn's multiple comparison test were used. *p*-values < 0.05 were considered significant.

3. Results

Forty-one patients were included: 19 tAPS, 11 oAPS, 11 bAPS (5 of them with secondary bAPS). The details are reported in Table 1.

Table 1. Clinical and biological characteristics of patients. tAPS: thrombotic antiphospholipid syndrome. oAPS: obstetrical antiphospholipid syndrome. bAPS: biological antiphospholipid syndrome. EPL: early pregnancy losses. IGR: placental insufficiency with intrauterine growth retardation. APL: antiphospholipid antibodies. LA: lupus anticoagulant. aCL: anticardiolipine. Anti- β 2GPI: anti-beta-2-glycoprotein I.

	Control	tAPS	oAPS	bAPS
N	28	19	11	11
Age (years)		49.5 \pm 18.3	36.3 \pm 8.8	57.1 \pm 19.7
Sex (women/men)		16/3	11	10/1
Thrombotic event				
Venous thrombosis		10		
Arterial thrombosis		7		
Both		2		
Obstetrical complication				
EPL			4	
Late miscarriages			4	
HELLP syndrome			2	
IGR			1	
APL				
LA		4	2	8
aCL IgM/IgG		7/5	1/6	5/3
Anti- β 2GPI IgM/IgG		0/4	1/1	3/0
Double positivity		1	1	
Triple positivity		2	2	3

Among tAPS, ten (53%) patients had venous thrombosis, seven arterial thrombosis (37%) and two had both. Three patients had secondary APS associated to SLE. The thrombotic events occurred 5.0 ± 4.6 years before TGA. During the study, the patients were treated with antiplatelet agents (5 low dose aspirin and 2 clopidogrel). Anticoagulant treatment was resumed after the study in the tAPS group (8 VKA and 2 rivaroxaban). Four patients with SLE were treated with hydroxychloroquine (HCQ). No patients developed thrombotic events during the stop and restart anticoagulation treatment.

Among oAPS, four (36%) had early pregnancy losses, four late miscarriages (36%), two HELLP syndromes, one feature of placental insufficiency with intrauterine growth retardation. No oAPS had a thrombosis history or other systemic diseases.

Among the 11 patients identified as bAPS, 6 patients had primary bAPS, diagnosed with increased activated partial thrombin time. Five (45%) were secondary to SLE in four cases and one to rheumatoid arthritis in four cases. No bAPS patient had double or triple positivity. Five patients had a lupus anticoagulant.

Hypercoagulability in Clinical Antiphospholipid Syndrome

Thrombin generation profiles showed a significant difference between APS groups (Figure 1A,B). When the APS groups were compared to the control group, bAPS had an increased lag time ($T_{\text{control}} = 4.89 \pm 1.65$ min vs. 13.6 ± 3.9 min) but no difference in thrombin formation. Thrombotic APS and oAPS had an increase of global thrombin generation ($ETP_{\text{control}} = 808$ nM.min (756–853) vs. 1265 nM.min (956–1741) and 1863 nM.min (1434–2080), respectively) ($Peak_{\text{control}} = 78$ nM (74–86) vs. 153 nM (109–215) and 254 nM.min (232–289), respectively).

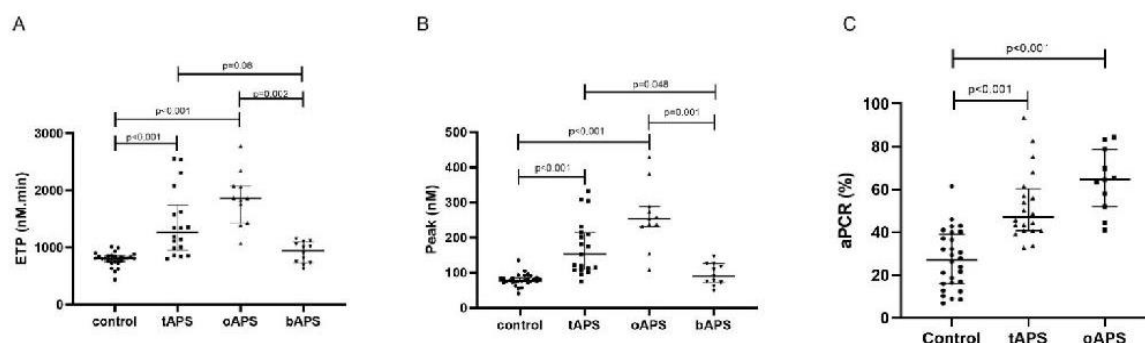


Figure 1. Thrombin generation profiles in antiphospholipid syndrome patients. (A) Endogenous thrombin potential. (B) Thrombin peak. (C) Activated protein C resistance. Kruskal–Wallis and Dunn’s multiple comparison test were used. tAPS: thrombotic antiphospholipid syndrome. oAPS: obstetrical antiphospholipid syndrome. bAPS: biological antiphospholipid syndrome. Circle is for control. Square is for thrombotic antiphospholipid syndrome in figure A et B, and obstetrical antiphospholipid for C. Triangle is for obstetrical antiphospholipid syndrome in figure A et B, and thrombotic antiphospholipid for C. tAPS and oAPS are described in legend.

A nonsignificant ETP increase was observed in tAPS ($p = 0.08$) and a significant increase in oAPS ($p = 0.02$), compared to bAPS. A significant thrombin peak increase was observed in tAPS ($p < 0.05$), oAPS ($p = 0.001$), compared to bAPS. No association was observed between thrombin generation and the type or number of aPL in tAPS and oAPS. One tAPS developed a recurrent thrombosis two years after TGA (ETP: 2538 nM.min; peak: 333 nM). Two oAPS patients developed a first thrombosis during three years after test (ETP: 2067 nM.min and 1867 nM.min; peak: 254.4 nM and 232 nM).

The activated protein C resistance was evaluated in the Sydney criteria APS group. An increased aPCR was observed in tAPS ($52.7 \pm 16.4\%$), oAPS ($64.1 \pm 14.6\%$) as compared to the control group ($27.2 \pm 13.8\%$) (Figure 1C).

4. Discussion

In this study, we showed a TG increase in tAPS and oAPS (consistent with the Sydney criteria for diagnosis of APS), compared to the control and bAPL. The assessment of TG in a patient with tAPS was safe in our study after transient discontinuation of anticoagulant.

Moreover, TG seems to be higher in oAPS, compared to tAPS. The first thrombotic event risk has been demonstrated in oAPS recently, in a retrospective study with 63% of deep vein thrombosis development at 7.6 years after postpartum [5]. Our results support the literature data, with a hypercoagulability increase in oAPS and a susceptibility risk to develop thrombo-embolic disease.

Primary prevention in APS is still controversial. The absolute risk of a first thrombosis is probably less than 1% per year, without associated comorbidity [17], and 5.3% if a triple positivity is associated, with male sex and additional risk factors for deep vein thrombosis [6]. The results of our study suggest that bAPS did not have a hypercoagulable state with an equivalent TG to the control group. Only an increased lag time was observed, as the same mechanism of delayed activated partial thrombin time. Thrombin generation could be used to confirm no prothrombotic states in bAPS.

In a secondary bAPS without thrombotic event, only a longer lag time was observed, whereas Pereira et al. showed a TG increase in SLE [18]. In their study, six patients had secondary APS. Profiles of TG were the same between SLE and secondary APS. However, Pereira et al. evaluated the TG secondary to pro-coagulant microparticles. Our results showed a nonsignificant increase of TG in secondary bAPS. Our SLE patients were treated with HCQ. Rand et al. showed a tissue factor decrease in APS patients under HCQ [19]. An endothelial cell model of APS showed a hypercoagulable state with TG increase [12]. Preliminary results showed that the prothrombotic state decreased when a mouse and endothelial cell model of APS were treated with HCQ [13]. The hydroxychloroquine

treatment could explain the absence of difference between secondary bAPS and the control group in thrombin generation profiles.

Activated protein C resistance is known to increase venous thrombotic risk in APS with an odd ratio equal to 3.31 (1.30–8.41) [20]. This aPCR was demonstrated in platelet rich plasma with TGA [11]. We showed an aPCR in tAPS, oAPS. A study by Zuily et al. confirmed an aPCR in APS, in a univariate analysis, superficial venous thrombotic inducing an increased risk of venous thrombotic development [21]. Our results confirmed the Zuily et al. study in aPCR on APS, and the possibility of performing aPCR research in PPP, which would permit delayed analysis.

Nevertheless, our study presents some limitations. First, given the small sample size, the study was not able to perform subgroup analysis or to compare subgroups of patients according to their arterial or venous presentation. Moreover only three patients had triple positivity in the entire cohort which prevented a comparison with any other antibody profile. Thrombin generation was performed after transient discontinuation of anticoagulant treatment in tAPS.

5. Conclusions

Our data suggest an increase of thrombin generation in thrombotic and obstetrical APS which was not found in patients with bAPS. The thrombin generation profile appears to be a reliable marker of hypercoagulability in APS after a short discontinuation of anticoagulant. A prospective follow up of a larger APS cohort might help to determine individual risk for a first thrombotic event in bAPS and oAPS, as well as the risk of recurrent thrombotic events in APS.

Author Contributions: P.B. designed the research, performed analysis, analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript. S.M. included patients and discussed the obtained results and critically revised the manuscript. H.L. and Y.B. included patients and discussed the obtained results and critically revised the manuscript. V.L.C.D. analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data are available from the corresponding author (paul.billoir@chu-rouen.fr).

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

References

1. Uthman, I.; Noureldine, M.H.A.; Ruiz-Irastorza, G.; Khamashta, M. Management of Antiphospholipid Syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* **2018**. [[CrossRef](#)]
2. Cervera, R.; Serrano, R.; Pons-Estel, G.J.; Cervera, R.; Cervera, R.; Cervera, R.; Cervera, R.; Cervera, R.; Cervera, R.; Cervera, R.; et al. Morbidity and Mortality in the Antiphospholipid Syndrome during a 10-Year Period: A Multicentre Prospective Study of 1000 Patients. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *74*, 1011–1018. [[CrossRef](#)]
3. Belizna, C.; Stojanovich, L.; Cohen-Tervaert, J.W.; Fassot, C.; Henrion, D.; Loufrani, L.; Nagy, G.; Muchardt, C.; Hasan, M.; Ungeheuer, M.N.; et al. Primary Antiphospholipid Syndrome and Antiphospholipid Syndrome Associated to Systemic Lupus: Are They Different Entities? *Autoimmun. Rev.* **2018**, *17*, 739–745. [[CrossRef](#)]
4. Pons-Estel, G.J.; Andreoli, L.; Scanzi, E.; Cervera, R.; Tincani, A. The Antiphospholipid Syndrome in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Autoimmun.* **2017**, *76*, 10–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. De Jesús, G.R.; Sciascia, S.; Andrade, D.; Nascimento, I.S.; Rosa, R.; Barbhuiya, M.; Tektonidou, M.; Banzato, A.; Pengo, V.; Ji, L.; et al. Factors Associated with First Thrombosis in Patients Presenting with Obstetric Antiphospholipid Syndrome in APS Alliance For Clinical Trials & International Networking (APS ACTION) Clinical Database And Repository: A Retrospective Study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2018**. [[CrossRef](#)]

6. Pengo, V.; Testa, S.; Martinelli, I.; Ghirarduzzi, A.; Legnani, C.; Gresele, P.; Passamonti, S.M.; Bison, E.; Denas, G.; Jose, S.P.; et al. Incidence of a First Thromboembolic Event in Carriers of Isolated Lupus Anticoagulant. *Thromb. Res.* **2015**, *135*, 46–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Billoir, P.; Duflot, T.; Fresel, M.; Chrétien, M.H.; Barbay, V.; Le Cam Duchez, V. Thrombin Generation Profile in Non-Thrombotic Factor V Leiden Carriers. *J. Thromb. Thrombolysis* **2019**. [[CrossRef](#)]
8. Billoir, P.; Alexandre, K.; Duflot, T.; Roger, M.; Miranda, S.; Gorla, O.; Joly, L.M.; Demeyere, M.; Feugray, G.; Brunel, V.; et al. Investigation of Coagulation Biomarkers to Assess Clinical Deterioration in SARS-CoV-2 Infection. *Front. Med.* **2021**, *8*. [[CrossRef](#)]
9. Hemker, H.C.; Al Dieri, R.; De Smedt, E.; Béguin, S. Thrombin Generation, a Function Test of the Haemostatic-Thrombotic System. *Thromb. Haemost.* **2006**, *96*, 553–561.
10. Regnault, V.; Béguin, S.; Wahl, D.; de Maistre, E.; Coenraad Hemker, H.; Lecompte, T. Thrombinography Shows Acquired Resistance to Activated Protein C in Patients with Lupus Anticoagulants. *Thromb. Haemost.* **2003**, *89*, 208–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Zuily, S.; Ait Aissa, K.; Membre, A.; Regnault, V.; Lecompte, T.; Wahl, D. Thrombin Generation in Antiphospholipid Syndrome. *Lupus* **2012**, *21*, 758–760. [[CrossRef](#)]
12. Billoir, P.; Miranda, S.; Damian, L.; Richard, V.; Benhamou, Y.; Le Cam Duchez, V. Development of a Thrombin Generation Test in Cultured Endothelial Cells: Evaluation of the Prothrombotic Effects of Antiphospholipid Antibodies. *Thromb. Res.* **2018**, *169*, 87–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Miranda, S.; Billoir, P.; Damian, L.; Thiebaut, P.A.; Schapman, D.; Le Besnerais, M.; Jouen, F.; Galas, L.; Levesque, H.; Le Cam-Duchez, V.; et al. Hydroxychloroquine Reverses the Prothrombotic State in a Mouse Model of Antiphospholipid Syndrome: Role of Reduced Inflammation and Endothelial Dysfunction. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Billoir, P.; Blandinières, A.; Gendron, N.; Chocron, R.; Gunther, S.; Philippe, A.; Guerin, C.L.; Israël-Biet, D.; Smadja, D.M. Endothelial Colony-Forming Cells from Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients Have a High Procoagulant Potential. *Stem Cell Rev. Rep.* **2020**. [[CrossRef](#)]
15. Miyakis, S.; Lockshin, M.D.; Atsumi, T.; Branch, D.W.; Brey, R.L.; Cervera, R.; Derksen, R.H.W.M.; De Groot, P.G.; Koike, T.; Meroni, P.L.; et al. International Consensus Statement on an Update of the Classification Criteria for Definite Antiphospholipid Syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 295–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Pengo, V.; Tripodi, A.; Reber, G.; Rand, J.H.; Ortel, T.L.; Galli, M.; De Groot, P.G. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Update of the Guidelines for Lupus Anticoagulant Detection. *J. Thromb. Haemost.* **2009**, *7*, 1737–1740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Garcia, D.; Erkan, D. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1290. [[CrossRef](#)]
18. Pereira, J.; Alfaro, G.; Goycoolea, M.; Quiroga, T.; Ocqueteau, M.; Massardo, L.; Pérez, C.; Sáez, C.; Panes, O.; Matus, V.; et al. Circulating Platelet-Derived Microparticles in Systemic Lupus Erythematosus. Association with Increased Thrombin Generation and Procoagulant State. *Thromb. Haemost.* **2006**, *95*, 94–99.
19. Schreiber, K.; Breen, K.; Parmar, K.; Rand, J.H.; Wu, X.-X.; Hunt, B.J. The Effect of Hydroxychloroquine on Haemostasis, Complement, Inflammation and Angiogenesis in Patients with Antiphospholipid Antibodies. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **2018**, *57*, 120–124. [[CrossRef](#)]
20. Kassis, J.; Neville, C.; Rauch, J.; Busque, L.; Chang, E.R.; Joseph, L.; Le Comte, M.; Subang, R.; Fortin, P.R. Antiphospholipid Antibodies and Thrombosis: Association with Acquired Activated Protein C Resistance in Venous Thrombosis and with Hyperhomocysteinemia in Arterial Thrombosis. *Thromb. Haemost.* **2004**, *92*, 1312–1319. [[CrossRef](#)]
21. Zuily, S.; Regnault, V.; Guillemin, F.; Kaminsky, P.; Rat, A.-C.; Lecompte, T.; Wahl, D. Superficial Vein Thrombosis, Thrombin Generation and Activated Protein C Resistance as Predictors of Thromboembolic Events in Lupus and Antiphospholipid Patients. A Prospective Cohort Study. *Thromb. Res.* **2013**, *132*, e1–e7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Manuscrit numéro 5

Le cinquième travail portait sur la fibrose pulmonaire idiopathique, un modèle de dysfonction endothéliale chronique, associée à un risque thrombotique élevé. Nous nous sommes intéressés aux ECFC de patient souffrant d’FPI et nous avons évalué l’impact du traitement sur ces précurseurs.

Une mise au point a été faite pour réaliser le test de génération de thrombine sur les ECFC en culture ; puis le comparer entre des groupes : “ECFC sang de cordon”, “ECFC témoin sain” et “ECFC FPI”. Les ECFC FPI démontraient un état hypercoagulable par rapport aux autres groupes d’ECFC. Cet état hypercoagulable est secondaire à une diminution d’expression de l’EPCR à la surface de ces cellules. Nous nous sommes ensuite intéressés à la modulation de cet état hypercoagulable par les différents traitements de la FPI (Nintedanib, Pirféridone, Epoprosténol, Treprostinil). Un état hypercoagulable apparaissait sur le test de génération de thrombine avec l’ajout de ces différentes molécules dans les milieux de cultures. Cet état hypercoagulable est secondaire aux propriétés antiangiogéniques et anti mitotiques des différentes molécules.

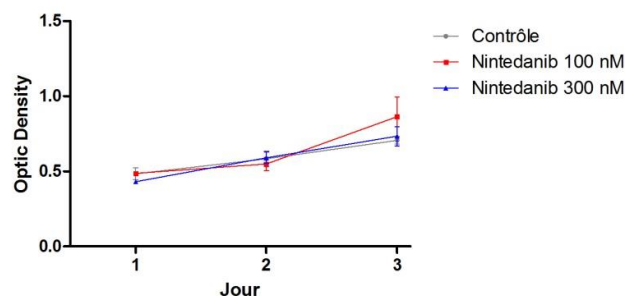
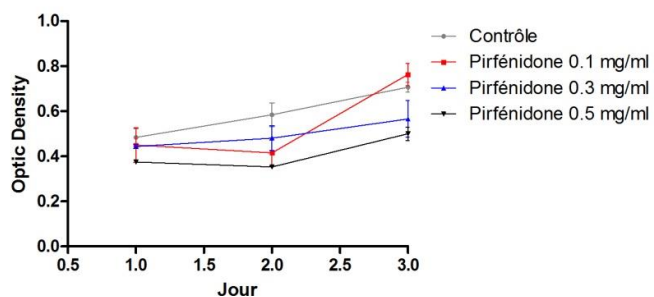
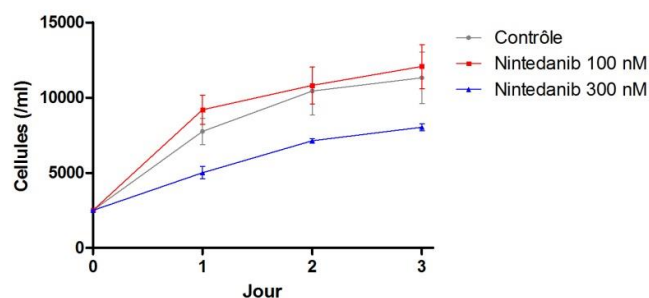
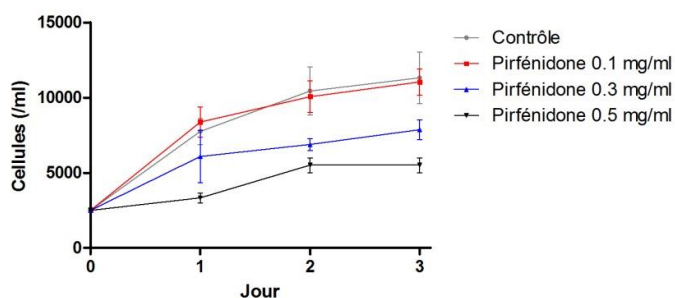
La question de la thrombose et des indications de l’anticoagulation chez les patients atteints de FPI font l’objet d’un débat considérable. Des études en laboratoire et des modèles animaux ont démontré un déséquilibre associé entre la thrombose et la fibrinolyse et ont suggéré que l’activation de la cascade de coagulation pourrait être importante dans la pathogénie de l’FPI (198). Le taux d’embolie pulmonaire est significativement plus élevé dans l’FPI que chez les témoins (165). De plus, les patients atteints d’FPI présentent des niveaux élevés de facteurs tissulaires et une fibrinolyse altérée dans l’espace alvéolaire, ce qui reflète une perturbation de la coagulation activée intra-alvéolaire (336). Le potentiel profibrotique des facteurs de coagulation et le rôle des PAR dans la médiation de la prolifération des fibroblastes induits par la thrombine et le dépôt de la matrice extracellulaire ont été décrits dans des modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire. La thrombine est un activateur majeur des PAR-1, PAR-3 et PAR-4 alors que les PAR-1 peuvent également être activés par la PCa.

Les ECFC ont été décrites comme étant dérivées des vaisseaux pulmonaires et également comme une biopsie liquide des vaisseaux pulmonaires lorsqu’elles sont isolées dans le sang périphérique (337). Par conséquent, les propriétés procoagulantes accrues des ECFC confirment le phénotype vasculaire modifié des cellules endothéliales déjà décrit dans la FPI et pourraient argumenter en faveur de leur contribution spécifique à sa physiopathologie. Nous avons démontré une augmentation de la génération de thrombine dans les ECFC qui pourrait être liée à une diminution de l’expression de la TM et de l’EPCR induisant une diminution de la PCa chez les patients atteints d’FPI. Ce résultat est conforme à une diminution de la génération de PCa précédemment observée dans l’FPI (338), à une augmentation de la mortalité dans les modèles de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine avec de faibles niveaux de PCa (339), corrigée par un traitement avec la PCa (340) ou la TM recombinante (341). Des études antérieures dans un modèle endothélial du SAPL ont démontré une

hypercoagulabilité dans les cellules endothéliales avec génération de thrombine. L'hypercoagulabilité était dépendante de la résistance à la protéine C activée dans le modèle de souris, et avec une diminution de la thrombomoduline et du récepteur de la protéine C endothéliale dans les cellules endothéliales.

Notre hypothèse est également soutenue par l'augmentation du taux d'exacerbation aiguë et du risque de mortalité observée dans l'FPI sous traitement à la warfarine (342,343). Dans ce contexte, il convient de souligner que la warfarine, contrairement à tous les autres anticoagulants, diminue l'activation de la protéine C, ce qui accentue le défaut de base observé dans l'FPI.

Cette étude est la première à examiner la génération de thrombine sur les ECFC dans l'FPI. Les propriétés procoagulantes modifiées des ECFC pourraient être liées à la diminution de l'expression d'EPCR et de TM. Cette nouvelle découverte plaide fortement en faveur d'un rôle des ECFC dans la physiopathologie de la FPI.



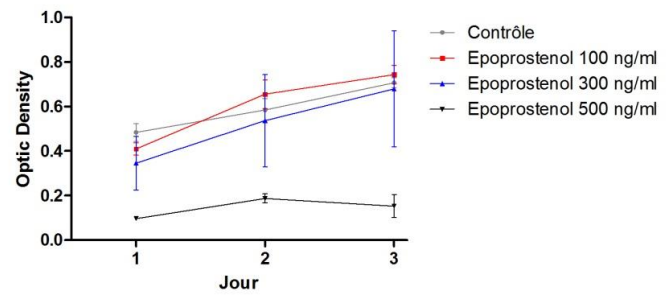
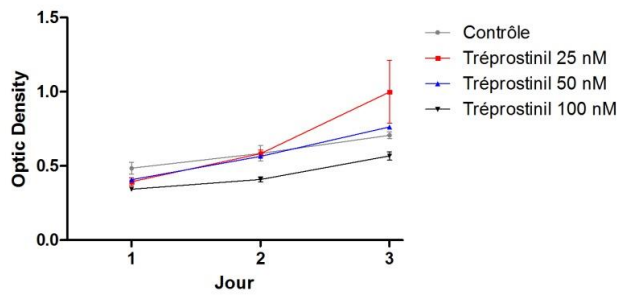
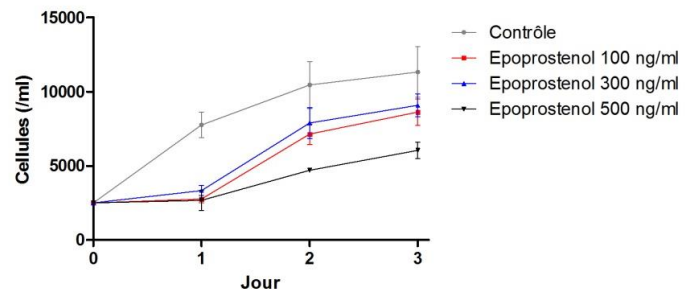
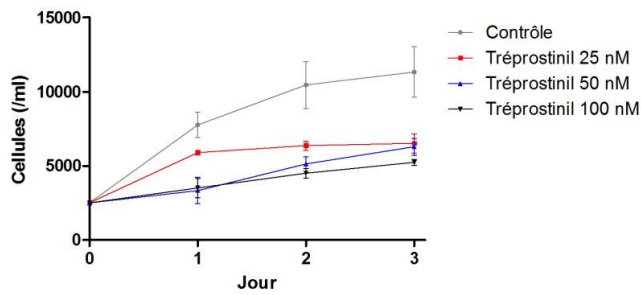


Figure 16. Etude de prolifération des ECFC incubés avec les différents traitements de la fibrose pulmonaire idiopathique

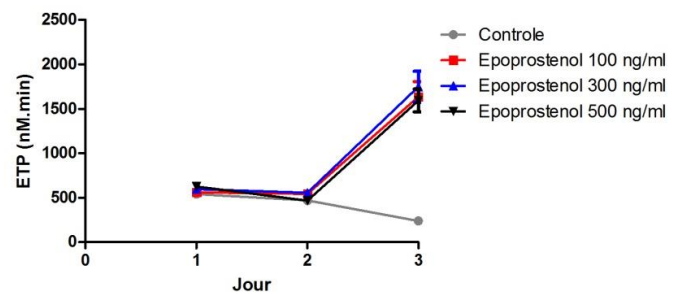
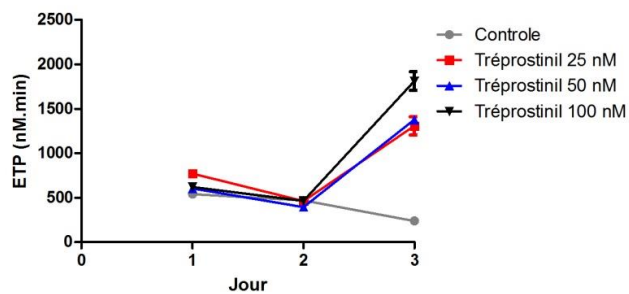
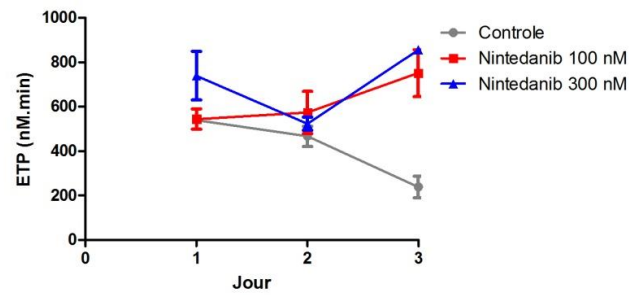
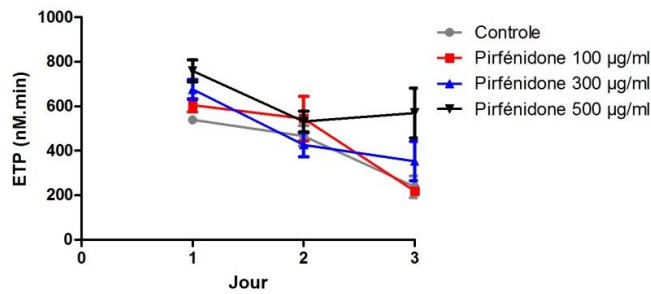


Figure 17. Augmentation du TGT pour les ECFC incubés avec les différents traitements de la fibrose pulmonaire idiopathique



Endothelial Colony-Forming Cells from Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients Have a High Procoagulant Potential

Paul Billoir^{1,2} · Adeline Blandinières¹ · Nicolas Gendron¹ · Richard Chocron³ · Sven Gunther⁴ · Aurélien Philippe¹ · Coralie L. Guerin⁵ · Dominique Israël-Biet⁶ · David M. Smadja¹

Accepted: 10 September 2020

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a severe, progressive and irreversible lung disease constantly associated with a major vascular remodeling process. Endothelial colony-forming cells (ECFCs) are human vasculogenic cells proposed as a cell therapy product or liquid biopsy in vascular disorders. Since the link between IPF and thrombosis has been largely proposed, the aim of our study was to explore hypercoagulability states in ECFCs from patients with IPF. We performed Thrombin generation assay (TGA) in cord blood (CB)-ECFCs, peripheral blood (PB)-ECFCs and IPF-ECFCs. Endogenous thrombin potential and peak were higher in IPF-ECFCs compared to CB-ECFCs and PB-ECFCs. As thrombin generation in ECFCs was increased, we evaluated anticoagulant proteins expressed on ECFCs membrane and identified thrombomodulin and EPCR. We found a significant decrease of both anticoagulant proteins at membrane using flow cytometry. This study is the first to examine ECFC thrombin generation in IPF. This new finding strongly argues for a role of ECFC in IPF pathophysiology and thrombotic related disorders in IPF.

Keywords Endothelial progenitor · Endothelial colony forming cells · ECFCs · Idiopathic pulmonary fibrosis · EPCR · Thrombomodulin · Thrombin generation assay

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a severe, progressive and irreversible lung disease. It mainly occurs in older adults and the prognosis is poor with a declining lung function, progressive dyspnea and a median survival after diagnosis comprised between 2 and 4 years

without treatment (1). Moreover, IPF lung parenchymal lesions are constantly associated with a major vascular remodeling process combining a rarefaction of vessels in fibrotic areas and their aberrant proliferation at the border of these areas (2, 3). It is associated with an imbalance between markers of endothelial activation and regeneration (4).

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12015-020-10043-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ David M. Smadja
david.smadja@aphp.fr

¹ Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, 75006 Paris, AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75006 Paris, France, Service d'Hématologie et Laboratoire de Recherches Biochimiques (Fondation Carpentier), 75015 Paris, France

² Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, Rouen University Hospital, Vascular Hemostasis Unit, 76000 Rouen, France

³ Université de Paris, PARCC, INSERM, 75015 Paris, France, AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, Service d'accueil des urgences, 75015 Paris, France

⁴ Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, 75006 Paris, AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, Service de physiologie respiratoire et Laboratoire de Recherches Biochimiques (Fondation Carpentier), F-75015 Paris, France

⁵ Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, 75006 Paris, France, Institut Curie, Cytometry Platform, 75006 Paris, France

⁶ Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, 75006 Paris, France, AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, Service de pneumologie, 75015 Paris, France

Published online: 24 September 2020

Springer

Endothelial colony-forming cells (ECFCs) are a population of cells able to differentiate into endothelial cells and to form new blood vessels in adults. They have been investigated in several human lung diseases as a potential actor (5). Stem cells that give rise to ECFCs could be very small embryonic-like stem cells (6–8), but their clear origin is still a matter of debate. We previously demonstrated that ECFCs are downregulated in IPF compared to healthy controls (4) but they also have a modified phenotype with increased senescence and ability to secrete profibrinolytic microvesicles (9, 10). Epidemiological studies have established a link between IPF and thrombosis (11).

Since ECFCs have been proposed as a marker of thrombosis with specific phenotype associated with thrombosis (12), the aim of our study was to explore hypercoagulability states in ECFCs from IPF patients.

Patients and Methods

Study Population

A French prospective and multicentric cohort of IPF (COFI) was started in 2008 (registry number 2006–108). Inclusion criteria included the diagnosis of IPF, dating back less than 9 months, based on either surgical biopsy or a characteristic computerized tomography scan pattern of usual interstitial pneumonia according to the European Respiratory Society/American Thoracic Society consensus

Table 1 Clinical characteristics of idiopathic pulmonary fibrosis patients

	IPF patients (n = 4)
Male sex – n (%)	3 (75.0)
Age - years, median [IQR]	75.4 [59.6–79.8]
BMI - kg/m ² , median [IQR]	21.9 [20.4–24.5]
CV risk factors	
Hypertension – n (%)	0 (0.0)
Dyslipidemia – n (%)	0 (0.0)
Diabetes – n (%)	0 (0.0)
Chronic kidney disease – n (%)	0 (0.0)
Tobacco users – n (%)	2 (50.0)
Medical history	
Cancer – n (%)	1 (25.0)
Coronary heart disease – n (%)	0 (0.0)
Atrial Fibrillation – n (%)	0 (0.0)
Stroke – n (%)	0 (0.0)
Previous DVT – n (%)	1 (25.0)

IPF: Idiopathic pulmonary fibrosis patients BMI: Body mass index. CV: Cardiovascular. DVT: Deep vein thrombosis.

(13) and reviewed according to the updated guidelines (14). Three teaching hospitals in the Ile-de-France area participated in the study of circulating endothelial compartment in these patients, which was specifically approved by the Ethics committee of Ile-de-France II (registry number 2006–108). Control adult samples were from healthy adult volunteers provided by a blood bank (CPSL UNT N12/12/064). Clinical characteristics of IPF patients are detailed in Table 1. Median age was 75.4 years [IQR: 59.6–75.4 years]. Two IPF patients were tobacco smokers and one had cancer history.

Cells Isolation and Culture

Human umbilical cord bloods were obtained from the Cell therapy Unit of Saint-Louis Hospital (AP-HP, Paris). Cord-blood (CB) endothelial colony-forming cells (CB-ECFCs) were isolated from the adherent mononuclear cell fraction as previously described (15, 16). ECFCs were isolated from IPF patients (IPF-ECFCs) and adult peripheral blood (PB)-ECFCs from control adult samples as previously described (15, 16). ECFCs were then expanded on fibronectin-coated plates (Merck, Germany) using EGM-2MV (Lonza, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and used between passages 3 to 6.

Exploration of ECFC Procoagulant Properties

Thrombin generation assay (TGA) is a functional test exploring global coagulation in plasma and, also, in endothelial cells (17). An increase in thrombin generation demonstrated a hypercoagulable state, and reflected indirectly an endothelial injury (17). Thrombin generation assay was performed in cells, as previously described, allowing to evaluate protein C activation (17). In short, ECFCs were spiked on fibronectin coated 96-well plates adapted to TGA (1500 cells/well). After 3 days, culture media was removed and 80 µl of platelet poor plasma per well from healthy voluntary was added (cryocheck™ pooled normal plasma, Cryopep, France). TGA was triggered with PPP low reagent (Diagnostica Stago, France). Total thrombin formation (ETP: endogenous thrombin potential) and maximum peak were measured by Calibrated Automated Thrombography and Fluorocan Ascent Fluorometer (Thermoscientific LabSystems, Finland). The experiment was performed in duplicate. Thrombomodulin (TM) and endothelial protein C receptor (EPCR) quantification (PE/Cy7 anti-human CD141 and PE anti-human CD201 respectively, Biologend) were identified by flow cytometry (acoustic focusing cytometer Attune, Life Technologies TM). Statistical analyses included a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test for post hoc pairwise comparison in case of significant differences.

Characterization of ECFCs by RT-qPCR

ECFCs in culture were lysed in RNable (Eurobio, France). RNA was extracted with chloroform and precipitated with isopropanol before reverse transcription in cDNA using the Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen, Germany) as per manufacturer's instructions. Real-time polymerase chain reaction was performed as previously described (15, 18). Probes for transcripts of interest were *PLAT* (t-PA, Hs00263492-m1, Life Technologies, USA), *PLAU* (u-PA, Hs01547054_m1, Life Technologies, USA), *PLAUR* (uPAR, Hs00182181_m1, Life Technologies, USA) and

SERPINE1 (PAI-1, Hs01126606_m1, Life Technologies, USA). To be used as an endogenous RNA control, we quantified human *GAPDH* transcripts (4326317E, Life Technologies, USA). Data were analyzed using the SDS v2.3 software and are expressed as "normalized mRNA level" as described earlier (15, 18).

Results and Discussion

We performed TGA in CB-ECFCs, PB-ECFCs and IPF-ECFCs. Endogenous thrombin potential and peak are

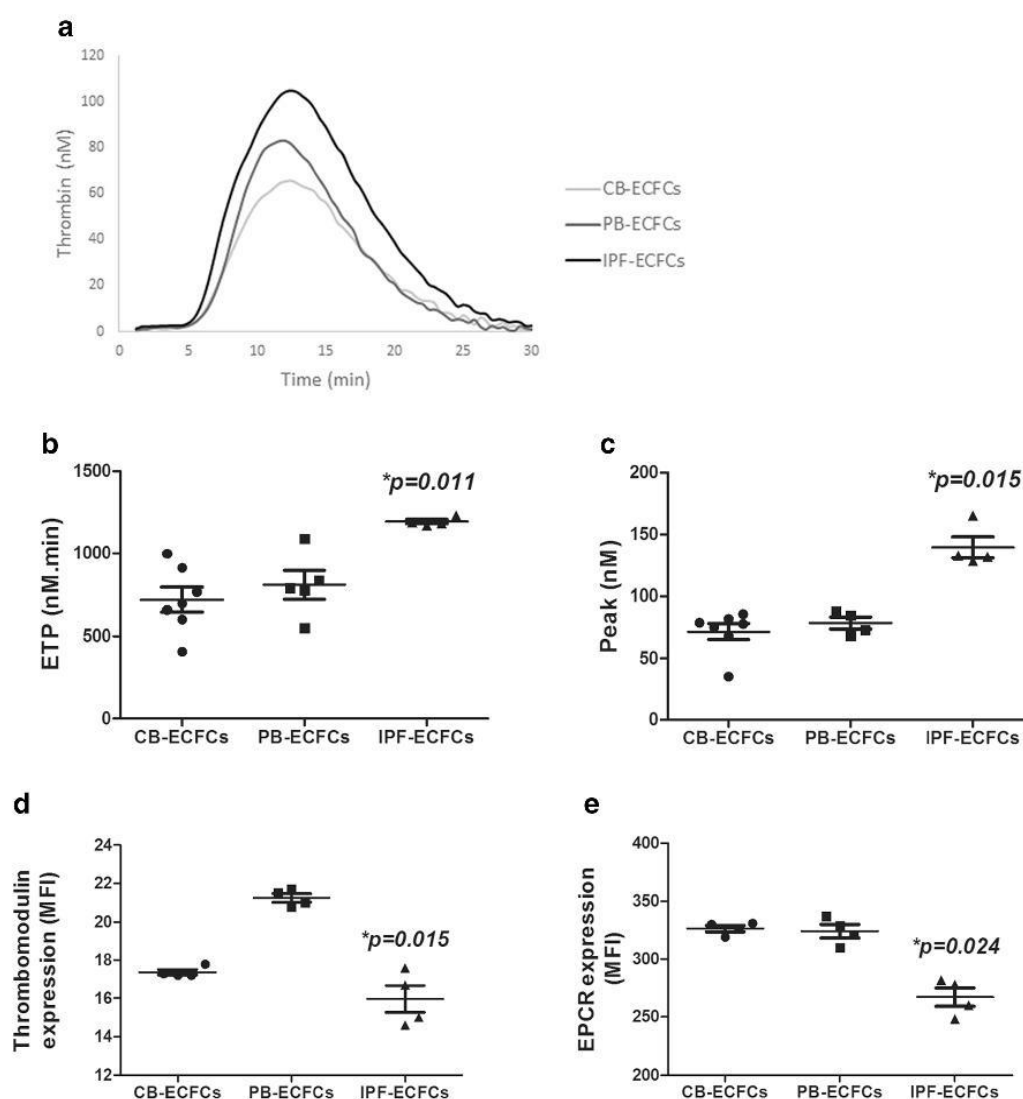


Fig. 1 Hypercoagulability characterization of IPF-ECFCs compared to CB-ECFCs and PB-ECFCs. **(a)**: Thrombin generation evaluated by calibrated automated thrombinography in CB, PB and IPF-ECFCs. Increase of ETP **(b)** and peak **(c)** in IPF-ECFCs. Quantitative expression of

thrombomodulin (TM) **(d)** and endothelial protein C receptor (EPCR) **(e)** evaluated by flow cytometry. MFI: mean fluorescence intensity. Statistical analyses included a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test

increased in IPF-ECFCs compared to CB-ECFCs and PB-ECFCs (ETP_{CB-ECFCs}: 720 ± 197 nM.min, ETP_{PB-ECFCs}: 809 ± 192 nM.min, ETP_{IPF-ECFCs}: 1194 ± 25 nM.min, $p = 0.011$, Fig. 1) (Peak_{CB-ECFCs}: 71.6 ± 17.1 nM, Peak_{PB-ECFCs}: 78.4 ± 9.5 nM, Peak_{IPF-ECFCs}: 139.6 ± 17.4 nM, $p = 0.015$). No significant difference was found between lag times (Lagtime_{CB-ECFCs}: 6.87 min [6.25–9.50 min], Lagtime_{PB-ECFCs}: 6.67 min [6.04–7.61 min], Lagtime_{IPF-ECFCs}: 7.77 min [7.75–7.93 min], $p = 0.278$) or TTP (TTP_{CB-ECFCs}: 12.08 min [11.87–15.97 min], TTP_{PB-ECFCs}: 11.46 min [10.84–13.75 min], TTP_{IPF-ECFCs}: 12.87 min [12.30–13.11 min], $p = 0.444$, supplementary Fig. 1). As thrombin generation in ECFCs was increased, we evaluated anticoagulant protein expressed on ECFCs membrane. We performed TM and EPCR quantification using flow cytometry. We found a significant decrease of TM (MFI_{CB-ECFCs}: 17.4 ± 0.3, MFI_{PB-ECFCs}: 21.3 ± 0.42, MFI_{IPF-ECFCs}: 16.0 ± 1.4; $p = 0.015$, Fig. 1D) and EPCR expression (MFI_{CB-ECFCs}: 326.5 ± 5.4, MFI_{PB-ECFCs}: 324.3 ± 11.5, MFI_{IPF-ECFCs}: 267.0 ± 15.9; $p = 0.024$, Fig. 1E). Finally, since prothrombotic states, in particular in IPF (10), are largely influenced by fibrinolysis, we explored all endothelial levels of fibrinolysis actors (tPA, uPA, uPAR and PAI-1) in IPF-ECFCs or controls ECFCs. As described in supplementary Fig. 2, we did not find any significant difference in mRNA levels between IPF-ECFCs and PB-ECFCs.

Considerable debate surrounds the issue of thrombosis and the indications of anticoagulation in IPF patients. Laboratory studies and animal models have demonstrated an associated imbalance between thrombosis and fibrinolysis and suggested that the activation of the clotting cascade may be important in the pathogenesis of IPF (11). Pulmonary embolism rate is significantly higher in IPF than in controls (19). Moreover, IPF patients have elevated TF levels and an impaired fibrinolysis in the alveolar space, which reflects a disturbance of intraalveolar activated coagulation (20). The profibrotic potential of coagulation factors and the role of protease-activated receptors (PAR) in mediating thrombin-induced fibroblasts proliferation and extracellular matrix deposition have been described in experimental models of pulmonary fibrosis (11). Thrombin is a key enzyme in coagulation cascade and a major activator of PAR-1, PAR-3 and PAR-4 whereas PAR-1 can also be activated by activated protein C (APC). In IPF, thrombin is an inducer of fibrogenic cytokines (21, 22) and has been found in increased concentration in bronchoalveolar lavage from patients with fibrotic lung disease (23). Moreover, in a mouse model of IPF, direct thrombin inhibitor demonstrates a decrease of the profibrotic effects (24). We think it is a suitable test to assess hypercoagulability in IPF-ECFCs. TGA is a functional test exploring global coagulation. Hypercoagulable states can be detected by thrombinogram. The interest of the thrombin generation assay on endothelial cells is to be modulated by thrombomodulin and EPCR expressed by endothelial cells, which are not

evaluated by the TGA in plasma. TGA in cultured endothelial cells has been described to be a good test to explore mechanism of prothrombotic states in disease states with endothelial dysfunction (17, 25). The concentration of TF used is low and initiates coagulation by mimicking a vascular breach. This concentration is the most appropriate way to assess coagulation amplification, allowing an overall assessment of coagulation activators (TF) and inhibitors (antithrombin, Protein C/S) (26). Since TF triggers the extrinsic pathway of the coagulation cascade leading to the production of thrombin, modification of TF levels on ECFCs associated with ETP and peak thrombin generation should be pathologically relevant since the thrombin generation test evaluates the overall activation. Potential interference with TF levels expression in ECFCs could thus explain the difference between controls and IPF-ECFCs and still need to be explored. Peak thrombin generation should be pathologically relevant since the thrombin generation test also evaluates inhibition of haemostasis by thrombomodulin and EPCR expressed by ECFCs in our study. Based on previous studies with endothelial model of antiphospholipid syndrome, we demonstrated a hypercoagulability of endothelial cells with thrombin generation (25). This hypercoagulability was dependent to APC resistance in mouse model, and with a decrease of TM and EPCR in endothelial cells (17). Thus, as demonstrated in Fig. 1D and E, we quantified thrombomodulin and EPCR on IPF-ECFCs in comparison with control-ECFCs. We found a significant decrease in both expressions that could explain differences in TGA. This result is in line with a decreased APC generation previously observed in IPF (27), and with an increased mortality in bleomycin-induced pulmonary fibrosis models with low APC levels (28) corrected by treatment with APC (29) or recombinant TM (30). Moreover, this result confirms endothelial pathophysiology relevance in IPF. ECFCs have been described as derived from pulmonary vessels and also as a liquid biopsy of pulmonary vessels when isolated in the PB (5). Therefore, the increased procoagulant properties of ECFCs associated with decreased expression of anticoagulant molecules on ECFC membrane as described here confirm the modified vascular phenotype of endothelial cells already described in IPF and might argue for their specific contribution to its pathophysiology. Our hypothesis is also supported by the increased acute exacerbation rate and risk of mortality observed in IPF patients under treatment with warfarin (21, 31). In this context, it should be underlined that warfarin, contrary to all other anticoagulants, decreases protein C activation, thus increasing the baseline defect observed in IPF.

This study is the first to examine ECFCs thrombin generation in IPF. Modified ECFC procoagulant properties could be related to their decreased EPCR and TM expression. This new finding strongly argues for a role of ECFCs in IPF pathophysiology.

Funding This work was supported by grants of the PROMEX STIFTUNG FÜR DIE FORSCHUNG Foundation.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest Authors have nothing to disclose.

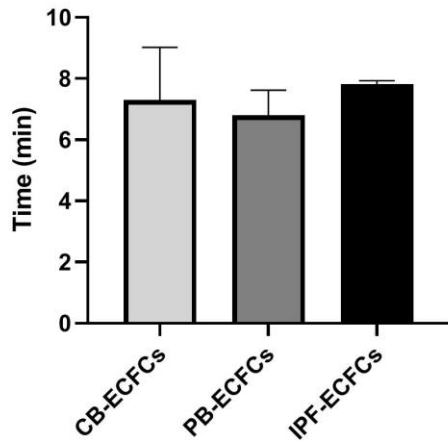
References

- Lederer, D. J., & Martinez, F. J. (2018 Aug 23). Idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 379(8), 797–798.
- Ebina, M., Shimizukawa, M., Shibata, N., Kimura, Y., Suzuki, T., Endo, M., Sasano, H., Kondo, T., & Nukiwa, T. (2004 Jun 1). Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169(11), 1203–1208.
- Ackermann, M., Stark, H., Neubert, L., Schubert, S., Borchert, P., Linz, F., et al. (2020 Mar). Morphomolecular motifs of pulmonary neoangiogenesis in interstitial lung diseases. *European Respiratory Journal*, 55(3), 1900933. <https://doi.org/10.1183/13993003.00933-2019>
- Smadja, D. M., Mauge, L., Nunes, H., d’Audigier, C., Juvin, K., Boric, R., et al. (2013 Jan). Imbalance of circulating endothelial cells and progenitors in idiopathic pulmonary fibrosis. *Angiogenesis*, 16(1), 147–157.
- Smadja, D. M., Melero-Martin, J. M., Eikenboom, J., Bowman, M., Sabatier, F., & Randi, A. M. (2019 Jul). Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the international society on thrombosis and Haemostasis SSC. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 17(7), 1190–1194.
- Guerin, C. L., Loyer, X., Vilar, J., Cras, A., Mirault, T., Gaussem, P., Silvestre, J. S., & Smadja, D. M. (2015 May). Bone-marrow-derived very small embryonic-like stem cells in patients with critical leg ischaemia: Evidence of vasculogenic potential. *Thrombosis and Haemostasis*, 113(5), 1084–1094.
- Smadja, D. M. (2017 Apr). Bone marrow very small embryonic-like stem cells: New generation of autologous cell therapy soon ready for prime time? *Stem Cell Reviews*, 13(2), 198–201.
- Ratajczak, M. Z., Ratajczak, J., Suszynska, M., Miller, D. M., Kucia, M., & Shin, D. M. (2017 Jan 06). A novel view of the adult stem cell compartment from the perspective of a quiescent population of very small embryonic-like stem cells. *Circulation Research*, 120(1), 166–178.
- Blandinieres, A., Gendron, N., Bacha, N., Bieche, I., Chocron, R., Nunes, H., et al. (2019 Jan). Interleukin-8 release by endothelial colony-forming cells isolated from idiopathic pulmonary fibrosis patients might contribute to their pathogenicity. *Angiogenesis*, 3.
- Bacha, N. C., Blandinieres, A., Rossi, E., Gendron, N., Nevo, N., Lecourt, S., et al. (2017 Apr). Endothelial microparticles are associated to pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Stem Cell Reviews*, 14(2), 223–235.
- Crooks, M. G., & Hart, S. P. (2015 Sep). Coagulation and anticoagulation in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Review*, 24(137), 392–399.
- Alvarado-Moreno, J. A., Hernandez-Lopez, R., Chavez-Gonzalez, A., Yoder, M. C., Rangel-Corona, R., Isordia-Salas, I., Hernandez-Juarez, J., Cerbulo-Vazquez, A., Gonzalez-Jimenez, M. A., & Majluf-Cruz, A. (2016 Jan). Endothelial colony-forming cells: Biological and functional abnormalities in patients with recurrent, unprovoked venous thromboembolic disease. *Thrombosis Research*, 137, 157–168.
- Raghu, G., Rochwerf, B., Zhang, Y., Garcia, C. A., Azuma, A., Behr, J., Brozek, J. L., Collard, H. R., Cunningham, W., Homma, S., Johkoh, T., Martinez, F. J., Myers, J., Protzko, S. L., Richeldi, L., Rind, D., Selman, M., Theodore, A., Wells, A. U., Hoogsteden, H., Schönemann, H. J., American Thoracic Society, European Respiratory Society, Japanese Respiratory Society, & Latin American Thoracic Association. (2015 Jul 15). An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. An update of the 2011 clinical practice guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192(2), e3–e19.
- Raghu, G., Remy-Jardin, M., Myers, J. L., Richeldi, L., Ryerson, C. J., Lederer, D. J., Behr, J., Cottin, V., Danoff, S. K., Morell, F., Flaherty, K. R., Wells, A., Martinez, F. J., Azuma, A., Bice, T. J., Bouros, D., Brown, K. K., Collard, H. R., Duggal, A., Galvin, L., Inoue, Y., Jenkins, R. G., Johkoh, T., Kazerooni, E. A., Kitaichi, M., Knight, S. L., Mansour, G., Nicholson, A. G., Pipavath, S. N. J., Buendía-Roldán, I., Selman, M., Travis, W. D., Walsh, S. L. F., & Wilson, K. C. (2018 Sep 1). Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 198(5), e44–e68.
- d’Audigier, C., Susen, S., Blandinieres, A., Mattot, V., Saubamea, B., Rossi, E., et al. (2018 Feb). Eglf7 represses the Vasculogenic potential of human endothelial progenitor cells. *Stem Cell Reviews*, 14(1), 82–91.
- Rossi, E., Poirault-Chassac, S., Bieche, I., Chocron, R., Schnitzler, A., Lokajczyk, A., et al. (2019 Mar). Human endothelial Colony forming cells express intracellular CD133 that modulates their Vasculogenic properties. *Stem Cell Reviews*, 16.
- Miranda, S., Billoir, P., Damian, L., Thiebaut, P. A., Schapman, D., Le Besnerais, M., et al. (2019). Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. *PLoS One*, 14(3), e0212614.
- Smadja, D. M., Bieche, I., Helley, D., Laurendeau, I., Simonin, G., Muller, L., et al. (2007 Sep-Oct). Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin alpha(6). *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(5), 1149–1161.
- Dalleywater, W., Powell, H. A., Fogarty, A. W., Hubbard, R. B., & Navaratnam, V. (2014 Dec). Venous thromboembolism in people with idiopathic pulmonary fibrosis: A population-based study. *The European Respiratory Journal*, 44(6), 1714–1715.
- Lin, C., Borensztajn, K., & Spek, C. A. (2017 Apr). Targeting coagulation factor receptors - protease-activated receptors in idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 15(4), 597–607.
- Alagha, K., Secq, V., Pahus, L., Sofalvi, T., Palot, A., Bourdin, A., & Chanez, P. (2015 Apr 15). We should prohibit warfarin in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191(8), 958–960.
- Tran, T., & Stewart, A. G. (2003 Mar). Protease-activated receptor (PAR)-independent growth and pro-inflammatory actions of thrombin on human cultured airway smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 138(5), 865–875.
- Hernandez-Rodríguez, N. A., Cambrey, A. D., Harrison, N. K., Chambers, R. C., Gray, A. J., Southcott, A. M., et al. (1995 Oct 21). Role of thrombin in pulmonary fibrosis. *Lancet*, 346(8982), 1071–1073.
- Shea, B. S., Probst, C. K., Brazee, P. L., Rotile, N. J., Blasi, F., Weinreb, P. H., et al. (2017 May). Uncoupling of the profibrotic and hemostatic effects of thrombin in lung fibrosis. *JCI Insight*, 4, 2(9).

25. Billoir, P., Miranda, S., Damian, L., Richard, V., Benhamou, Y., & Le Cam Duchez, V. (2018 Sep). Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: Evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies. *Thrombosis Research*, 169, 87–92.
26. Dargaud, Y., Wolberg, A. S., Gray, E., Negrier, C., & Hemker, H. C. (2017 Aug). Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: Communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 15(8), 1704–1707.
27. Yasui, H., Gabazza, E. C., Taguchi, O., Risteli, J., Risteli, L., Wada, H., Yuda, H., Kobayashi, T., Kobayashi, H., Suzuki, K., & Adachi, Y. (2000 Oct). Decreased protein C activation is associated with abnormal collagen turnover in the intraalveolar space of patients with interstitial lung disease. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 6(4), 202–205.
28. Lin, C., von der Thusen, J., van der Poll, T., Borensztajn, K., & Spek, C. A. (2015 Nov 15). Increased mortality during Bleomycin-induced pulmonary fibrosis due to low endogenous activated protein C levels. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192(10), 1257–1259.
29. Yasui, H., Gabazza, E. C., Tamaki, S., Kobayashi, T., Hataji, O., Yuda, H., et al. (2001 Jun). Intratracheal administration of activated protein C inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(7), 1660–1668.
30. Kataoka, K., Taniguchi, H., Kondoh, Y., Nishiyama, O., Kimura, T., Matsuda, T., Yokoyama, T., Sakamoto, K., & Ando, M. (2015 Aug). Recombinant human Thrombomodulin in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 148(2), 436–443.
31. Alagha, K., Bourdin, A., & Chanez, P. (2015 Nov 15). Reply: Increased mortality during Bleomycin-induced pulmonary fibrosis due to low endogenous activated protein C levels. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192(10), 1259–1260.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

A



B

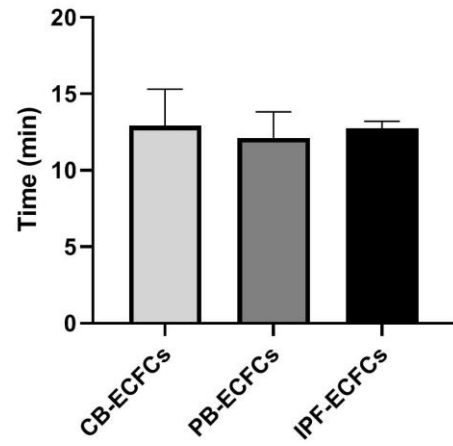


Figure 1 Supplemental. Lagtime and Time to peak of IPF-ECFCs compared to CB-ECFCs and PB-ECFCs. Lagtime (**A**) and Time to peak (**B**). Statistical analyses were Kruskal-Wallis test

Manuscrit numéro 6

Le dernier travail portait sur un modèle aigu de dysfonction endothéliale. Nous avons inclus des patients souffrant de COVID-19, et évalué si les marqueurs d'hypercoagulabilité pouvaient prédire une aggravation comme le transfert en réanimation et/ou le décès des patients.

Plusieurs études prédisent l'apparition de maladies graves (245,344,345) et la mortalité dans l'infection par Covid-19 (218,346,347). L'âge, l'augmentation de l'indice de masse corporelle, l'hypertension (348), le diabète et le sexe masculin (349) sont des facteurs de mauvais pronostic, et régulièrement retrouvés dans les scores prédictifs d'aggravation. Logiquement, l'oxygénodépendance avant l'admission était un facteur prédictif de l'aggravation de l'infection à SRAS-CoV-2. Parmi les marqueurs biologiques, l'augmentation de la protéine C-réactive et de l'urée sont dans les scores pronostiques. La protéine C-réactive peut augmenter rapidement après le début d'une inflammation, d'une lésion cellulaire ou tissulaire. Lors d'une septicémie, l'endothélium s'active dans tout l'arbre vasculaire. Le concept de dysfonctionnement endothélial induit par le sepsis est connu sous le nom de thromboinflammation (350). Peu d'études ont évalué les biomarqueurs de la coagulation pour prédire le transfert en unité de soins intensifs et le décès dans la Covid-19. Zhang *et al.* ont décrit une augmentation des D-dimères associée à un mauvais pronostic (351). Cependant, l'augmentation des D-dimères pendant l'hospitalisation avait une spécificité limitée pour prédire le décès (352). La protéine C-réactive était davantage corrélée à la gravité de la maladie que le D-dimère (353). Nos résultats suggèrent que le fibrinogène aurait un pouvoir discriminant élevé et de manière plus spécifique que les D-dimères.

Aucune étude n'a été rapportée sur les fragments 1+2 de la prothrombine dans la Covid-19. Les fragments 1+2 de la prothrombine sont moins affectés par l'inflammation que les D-dimères (354). Nous avons démontré une augmentation des fragments 1+2 de la prothrombine. Le TGT a déjà été utilisé pour évaluer l'hypercoagulabilité et le développement d'un accident vasculaire cérébral ischémique aigu. En effet, il a été établi que la microangiopathie et l'occlusion des capillaires alvéolaires chez les patients atteints de Covid-19 étaient secondaires à une thrombose vasculaire généralisée (217). La monocytopenie inférieure à 0,2 G/L pourrait être liée à la gravité de la Covid-19. Ceci est conforme au fait qu'une diminution du nombre de monocytes est associée à un mauvais pronostic dans le cas d'une septicémie (355). Le recrutement de monocytes est essentiel pour lutter efficacement contre les infections virales, bactériennes, fongiques et protozoaires, pour les éliminer (356). L'absence de recrutement peut également expliquer l'aggravation de la maladie.

L'intérêt de connaître l'évolution clinique de la Covid-19 permet de prédire le manque de lits dans les hôpitaux et une pénurie d'équipements médicaux. Plusieurs scores existent pour la prévision de la

mortalité dans les cas de pneumonie, comme le CURB-65, le score A-DROP et le score de mortalité 4C (218,357,358). Cependant, ces scores ne sont pas adaptés pour déterminer le transfert en unité de soins intensifs. Il est intéressant de noter que nos résultats ont démontré que l'association de l'oxygénodépendance, la monocytopénie, du taux de fibrinogène, du taux de fragments 1+2 de la prothrombine et du pic de thrombine sur le TGT pouvait prédire une amélioration ou une aggravation chez les patients atteints de Covid-19. Un score inférieur à 7,47 prédisait une amélioration et un score supérieur à 10,19 prédisait une aggravation pour chaque patient. Le score prédictif était meilleur que le score de mortalité 4C pour la détermination de l'aggravation clinique, comme le suggère l'analyse de la courbe ROC (ASC = 85,5 et 71,6 % respectivement). Cependant, l'objectif de notre score et celui du score de mortalité 4C ne sont pas les mêmes. L'intérêt du score prédictif de l'aggravation, y compris le transfert à l'unité de soins intensifs pendant l'hospitalisation, est d'instaurer un traitement rapide, y compris l'initiation de corticostéroïdes et le transfert vers les soins intensifs (233). Une étude récente démontre que les biomarqueurs de la coagulation sont des prédicteurs indépendants de l'augmentation des besoins en oxygène chez les patients COVID-19 (359). Une étude a confirmé que l'augmentation des D-dimères n'est pas associée au transfert en unité de soins intensifs (344).

Dans l'étude de Panigada *et al.* (223), le facteur Willbrand (antigène et cofacteur de la ristocétine) était très augmenté. Dans l'étude de Poissy *et al.* (240), les niveaux d'antigène du facteur Willebrand semblent être associés à un risque accru d'EP. Notre étude a démontré une augmentation de l'activité du vWF chez les patients dont l'état s'est aggravé. Cependant, l'activité de liaison du VWF:GPIIb n'était pas le facteur le plus prédictif du développement thrombotique pendant l'hospitalisation, la sensibilité et la spécificité de l'AUC étant respectivement de 76,0 %, 75,0 % et 75,8 %, avec un seuil de 305 %.

Selon de nombreux rapports, la Covid-19 expose les patients à un risque particulièrement élevé d'embolie pulmonaire (237). La prévalence de l'embolie pulmonaire en unité de soins intensifs est proche de 20 % (240). L'ISTH et l'American Society of Hematology ont recommandé une dose prophylactique d'héparine de bas poids moléculaire pour prévenir les événements thrombotiques (360,361). Même avec une thromboprophylaxie, 7,7% des patients de l'hôpital universitaire de Milan ont développé un événement thrombotique (241). L'association entre le score de Padua >4 et le D-dimère >1000 µg/L avait une sensibilité de 88,52% et une spécificité de 61,43% pour la prédiction d'un événement thrombotique (362). Dans notre étude, 7/8 des personnes ayant développé une EP étaient sous thromboprophylaxie. Avec les D-dimères, la sensibilité et la spécificité de l'AUC étant respectivement de 77,5 %, 75,0 % et 89,0 %, avec un seuil de 2555 µg/L. À l'admission, le pic de thrombine était extrêmement sensible (avec 100 %) et les fragments de prothrombine 1+2 étaient plus spécifiques pour prédire l'EP. L'association entre différents marqueurs hématologiques pourrait aider à prédire, et potentiellement à augmenter, la thromboprophylaxie par anticoagulation.

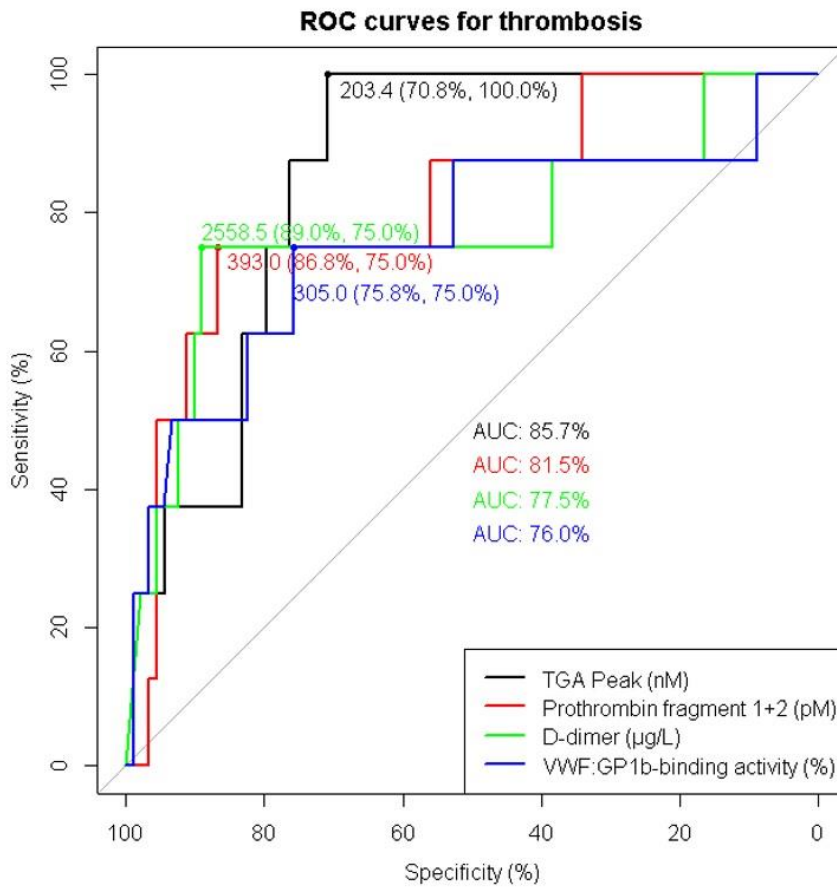


Figure 18. Courbe ROC prédisant la survenue d'un événement thrombotique chez les patients COVID19.



Investigation of Coagulation Biomarkers to Assess Clinical Deterioration in SARS-CoV-2 Infection

Paul Billoir^{1,2*}, Kevin Alexandre³, Thomas Dufflot⁴, Maxime Roger⁵, Sébastien Miranda^{2,6}, Odile Gorla⁷, Luc Marie Joly⁸, Mathieu Demeyere⁹, Guillaume Feugray¹, Valéry Brunel¹⁰, Manuel Etienne³ and Véronique Le Cam Duchez¹

¹ Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, CHU Rouen, Vascular Hemostasis Unit, Rouen, France, ² F-CRIN INNOVTE, St-Étienne, France, ³ Normandie Univ, UNIROUEN, EA2656, CHU Rouen, Department of Infectious Diseases, Rouen, France, ⁴ Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, CHU Rouen, Department of Pharmacology, Rouen, France, ⁵ CHU Rouen, Department of Pneumology, Rouen, France, ⁶ Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, CHU Rouen, Department of Internal Medicine, Rouen, France, ⁷ CHU Rouen, Department of Gastroenterology and Hepatology, Rouen, France, ⁸ Department of Emergency Medicine, Normandie Univ, UNIROUEN, CHU Rouen, Rouen, France, ⁹ CHU Rouen, Department of Radiology, Rouen, France, ¹⁰ Department of General Biochemistry, CHU Rouen, Rouen, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Zisis Kozlakidis,
International Agency for Research on
Cancer (IARC), France

Reviewed by:

Catherine Ropert,
Federal University of Minas
Gerais, Brazil
Debora Decote-Ricardo,
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Brazil

*Correspondence:

Paul Billoir
paul.billoir@chu-rouen.fr
orcid.org/0000-0001-5632-7713

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases—Surveillance,
Prevention and Treatment,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 22 February 2021

Accepted: 05 May 2021

Published: 04 June 2021

Citation:

Billoir P, Alexandre K, Dufflot T,
Roger M, Miranda S, Gorla O,
Joly LM, Demeyere M, Feugray G,
Brunel V, Etienne M and Le Cam
Duchez V (2021) Investigation of
Coagulation Biomarkers to Assess
Clinical Deterioration in SARS-CoV-2
Infection. *Front. Med.* 8:670694.
doi: 10.3389/fmed.2021.670694

Since December 2019, a pandemic caused by a new coronavirus has spread to more than 170 countries around the world. Worsening infected patients requiring intensive care unit (ICU) admission associated with 30% of mortality. A part of worsening is induced by hemostasis deregulation. The aim of this study was to investigate the association of coagulation activation in COVID-19 progression. Thirty-five of the 99 patients got clinically worse. The final model of the logistic regression analysis revealed that O₂ requirement (RR = 7.27 [1.50–19.31]), monocytes below 0.2G/L (RR = 2.88 [1.67–3.19]), fibrinogen levels (RR = 1.45 [1.17–1.82] per g/L increase), prothrombin fragments 1+2 higher than 290 pM (RR = 2.39 [1.20–3.30]), and thrombin peak (RR = 1.28 [1.03–1.59] per 50 nM increase) were associated with an increased risk of clinical worsening. A fibrinogen level threshold of 5.5 g/L, a thrombin peak measurement threshold of 99 pM, and O₂ requirement associated with clinical outcome in more than 80% of our cohort. In conclusion, we identified fibrinogen and thrombin peak at admission as coagulation biomarkers associated with an increased risk of ICU admission or death. This finding allows initiating steroids and triage for worsening patients. Our results should therefore be considered as exploratory and deserve confirmation.

Keywords: COVID-19, intensive care, hypercoagulability, fibrinogen, thrombin generation

INTRODUCTION

Since December 2019, a pandemic caused by a new coronavirus has spread to more than 170 countries around the world. It started in China (1) and then spread to Europe and the United States of America. This virus called SARS-CoV-2 (2) is responsible for an infectious disease itself called COVID-19. Most patients are asymptomatic or mildly symptomatic. In symptomatic patients, the clinical manifestations are dominated by respiratory symptoms (2, 3) characterized by serious lung complications that can lead to intensive care unit admission for acute respiratory distress syndrome (4, 5) and to a less extent to cardiovascular injuries (6).

The alteration of the endothelium could originate the deregulation of hemostasis (7). In addition, sepsis promotes platelet overactivation, leading to acute respiratory distress syndrome and acute renal failure (8, 9). Recommendations from the International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) and a retrospective study suggest that preventive anticoagulation in patients would be associated with a better prognosis (10, 11).

Prediction models that combine several variables to estimate the risk of people experiencing a poor outcome from the infection could assist medical staff in triaging patients when allocating limited healthcare resources (12). Several scores exist for prediction of mortality in pneumonia such as CURB-65 and A-DROP score (13, 14). Among them, the 4C (Coronavirus Clinical Characterization Consortium) Mortality Score is an easy-to-use and validated prediction tool for in-hospital mortality, accurately categorizing patients as being at low, intermediate, high, or very high risk of death in COVID-19 (AUC = 0.79) (15). However, fewer studies focused on coagulation biomarkers to assess the risk of COVID-19 complications and intensive care unit transfer. Among them, an increase in D-dimer levels has been associated with severe forms of the pathology (16) with other markers of disseminated intravascular coagulation (DIC). Clinical manifestations of these DIC were predominantly thrombotic with high venous thromboembolism rates (5).

Since the beginning of the pandemic, many studies confirmed an increase in D-dimer level (17, 18) and a cutoff value of 2,000 $\mu\text{g/L}$ in patients who were clinically worsening was determined (19). However, D-dimer level is a very sensitive but not a very specific marker of hypercoagulable state. Then, it is possible to assess coagulation globally, by measuring thrombin generation (20). This technique studies the initiation, propagation, and inhibition of coagulation allowing the observation of hypo- or hyper-coagulable risk profiles.

Thus, the aim of this study was to investigate the association of coagulation activation in COVID-19 progression and investigate how coagulation markers could be used to risk stratify patients.

METHODS

Patients

Between March 16 and May 1, 2020, 100 COVID-19 patients hospitalized in COVID-19 dedicated medical units were prospectively recruited (clinical trials registration number: NCT04367662). An informed consent was obtained from all subjects and citrated plasma from the initial blood test <24 h after the admission was collected, double centrifuged according to French Group of Hemostasis and Thrombosis (GFHT) guidelines, and frozen at -80°C within 4 h after collection. Clinical, radiological, and biological relevant data were also collected. The follow-up of patients were 15 days, with a phone call when a hospital discharged before 15 days.

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The institutional review board (person committee protection of Rouen University Hospital) and a national ethical committee (person committee protection South Mediterranean 1) approved the study, and a national anonymous data collection was declared (Authorization protocol number: 2020-A00914-35).

Computed Tomography Imaging

As defined by the European Society of Radiology (21), finding COVID-19 pneumonia in computed tomography scan were:

- A scale of disease extension (<10, 10–25%, 25–50%, 50–75%, >75%)
- Condensation type (nodular, linear, or both)
- Radiological abnormalities localization (unilateral, bilateral).

Assays

During initial blood test, prothrombin time (PT), activated partial thrombin time (aPTT) (DIAGNOSTICA STAGO–Asnières sur Seine, France), and D-dimer (VIDAS DEX2–Biomérieux–Marcy l'étoile, France) assays were performed.

After defrost, several coagulation tests were assayed:

- Fibrinogen (STA-Liquid Fib–DIAGNOSTICA STAGO–Asnières sur Seine, France), Fibrin monomers (STA-Liatest FM–DIAGNOSTICA STAGO–Asnières sur Seine, France), and chromogenic antithrombin assays (StachromATIII–DIAGNOSTICA STAGO–Asnières sur Seine, France) were realized on STARMax (DIAGNOSTICA STAGO–Asnières sur Seine, France).
- VWF:GPIb-binding activity (Innovance VWAc–Siemens Healthcare, Marburg, Germany) was assayed on BCS XP (Siemens Healthcare, Marburg, Germany).
- Prothrombin fragments 1+2 were assayed with Enzygnost F1+2 (Siemens Healthcare, Marburg, Germany) on Diasonrin Etimax.
- Complete blood count was performed on EDTA samples on XN-1000 (Sysmex, Villepinte, France).
- Thrombin generation assay (TGA) was triggered by a low concentration of tissue factor (TF) (1 pM) and a normal concentration of phospholipids (PPP low reagent, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France). TGA was measured by Calibrated Automated Thrombography and Fluorocan Ascent Fluorometer (Thermoscientific LabSystems, Helsinki, Finland).

ISTH Disseminated Intravascular Coagulation Score

Disseminated intravascular coagulation score (DIC) was calculated with ISTH criteria recommendation (22). Briefly, the scoring system included platelet count, prothrombin time, fibrinogen, and D-dimer or fibrin monomer.

Data and Statistical Analysis

The primary objective of the study was to evaluate the association of baseline hemostasis and clinical worsening on admission. Patients were considered to be clinically “worsening” if they were transferred to the intensive care unit or died and clinically “improving” if not. For patient characteristics, data were expressed as median [interquartile range or IQR], n (%), or n/N (%), where N is the total number of patients with available data. P -values comparing clinical improving to clinical worsening are from χ^2 test, Fisher's exact test, χ^2 with *Yates' correction* for continuity, Spearman correlation, or Mann–Whitney U -test when appropriate. Univariate logistic

regression analysis of clinical outcome (improving or worsening) was performed using the following variables as predictors: age, sex, O₂ requirement, tobacco consumption, radiological scale of disease extension (dichotomized to lower or higher than 25%), body mass index (BMI), hypertension, diabetes, respiratory disease (including COPD and/or asthma and/or other causes of respiratory disease), aPTT ratio (higher than 1.15), blood lymphocyte count (lower than 1 G/L), blood monocyte count (lower than 0.2 G/L), neutrophil-to-monocyte ratio, neutrophil-to-leucocyte ratio, D-dimer (higher than 1,000 µg/L), fibrinogen, TGA parameters (ETP, peak, and velocity), fibrin monomers (higher than 6 µg/ml), VWF: GPIIb-binding activity (higher than 250%), and F1+2 (higher than 290 pM). Significant predictors under unadjusted analysis were further analyzed by multiple logistic regression analysis (full model). Then, based on the Akaike Information Criterion (AIC), irrelevant variables were eliminated from the full model by backward variable selection to obtain the final model. Results from the logistic regressions were expressed as relative risk (RR) [95% confidence interval]. Finally, a decision tree based on the predictors retained in the logistic regression final model was built using recursive partitioning method with the following parameters: minimum number of observations that must exist in a node in order for a split to be attempted = 15, minimum number of observations in any terminal node = 5, leave-one-out cross-validation strategy, and complexity parameter that minimizes the cross-validation relative error.

Data and statistical analysis and captions were performed using *R v4.0.0* software (20) and the following software packages: *rROC* (21), *MASS* (22), *caret* (23), *sjstats* (24), *rpart* (25), and *rpart.plot* (26).

RESULTS

One hundred patients were recruited and followed up to hospital discharge or death. One patient opposed participation after analysis. With World Health Organization classification of COVID-19 severity in admission, 23 patients had pneumonia, 51 patients had severe pneumonia, and 26 patients had acute respiratory distress syndrome. During hospitalization, patients were considered to be clinically worsening ($n = 35$) if they were transferred to the intensive care unit ($n = 28$) or died ($n = 12$) and clinically improving if not. Five patients had anticoagulant treatment before admission for atrial fibrillation. During hospitalization, 46 patients had prophylactic anticoagulation. A second computed tomography was performed in case of respiratory worsening to diagnosis pulmonary embolism. Among them, nine patients developed venous thrombosis: five and three pulmonary embolisms in clinical worsening and improving group, respectively, and one superficial venous thrombosis in clinical improving group. Only one patient who had developed thrombosis did not have thromboprophylaxis. Median follow up was 20.5 days [13–27]. Each patient completed the follow up. No patient developed arterial thrombosis. Demographic and clinical data were reported in **Table 1**. Age and O₂ requirement at the time of admission were significantly different between groups.

As expected, anticoagulation instauration and hospitalization duration were reported to be significantly different between groups as well as the radiological scale of disease extension.

In biological markers, we observed a non-significant difference in lymphocyte blood count <1 G/L (50 vs. 67.6%) and a significant difference between clinical worsening and improving for monocyte blood count <0.2 G/L (1.6 vs. 17.6%). Biological characteristics were resumed in **Supplementary Table 1**. Significant differences are shown in **Figure 1**. Moreover, neutrophil/lymphocyte ratio was not significantly different (4.4 [2.5–7.5] vs. 5.7 [3.4–11.4]), and we demonstrated that neutrophil/monocyte ratio was increased in worsening group (8.8 [6.7–12.1] vs. 16.7 [9.0–19.8]). Fibrinogen levels and D-dimer were also increased in worsening group. Fibrin monomers and antithrombin levels were not significantly different. ISTH DIC score was calculated at the time of admission either with D-dimer or with Fibrin monomer. We observed a significant difference between worsening and improving patients with ISTH DIC score with D-dimer, and no difference with fibrin monomer scores was significant (2 [2–3] vs. 2 [2–2], and 0 [0–0.25] vs. 0 [0–1], respectively, with D-dimer and Fibrin monomer).

VWF:GPIIb-binding activity was also different ($P < 0.01$). Coagulation activation was studied thanks to thrombin generation assay and Prothrombin fragments 1+2 measurement with a significant difference among the two groups ($P < 0.05$).

Association Between Clinical–Biological Parameters and Clinical Outcome

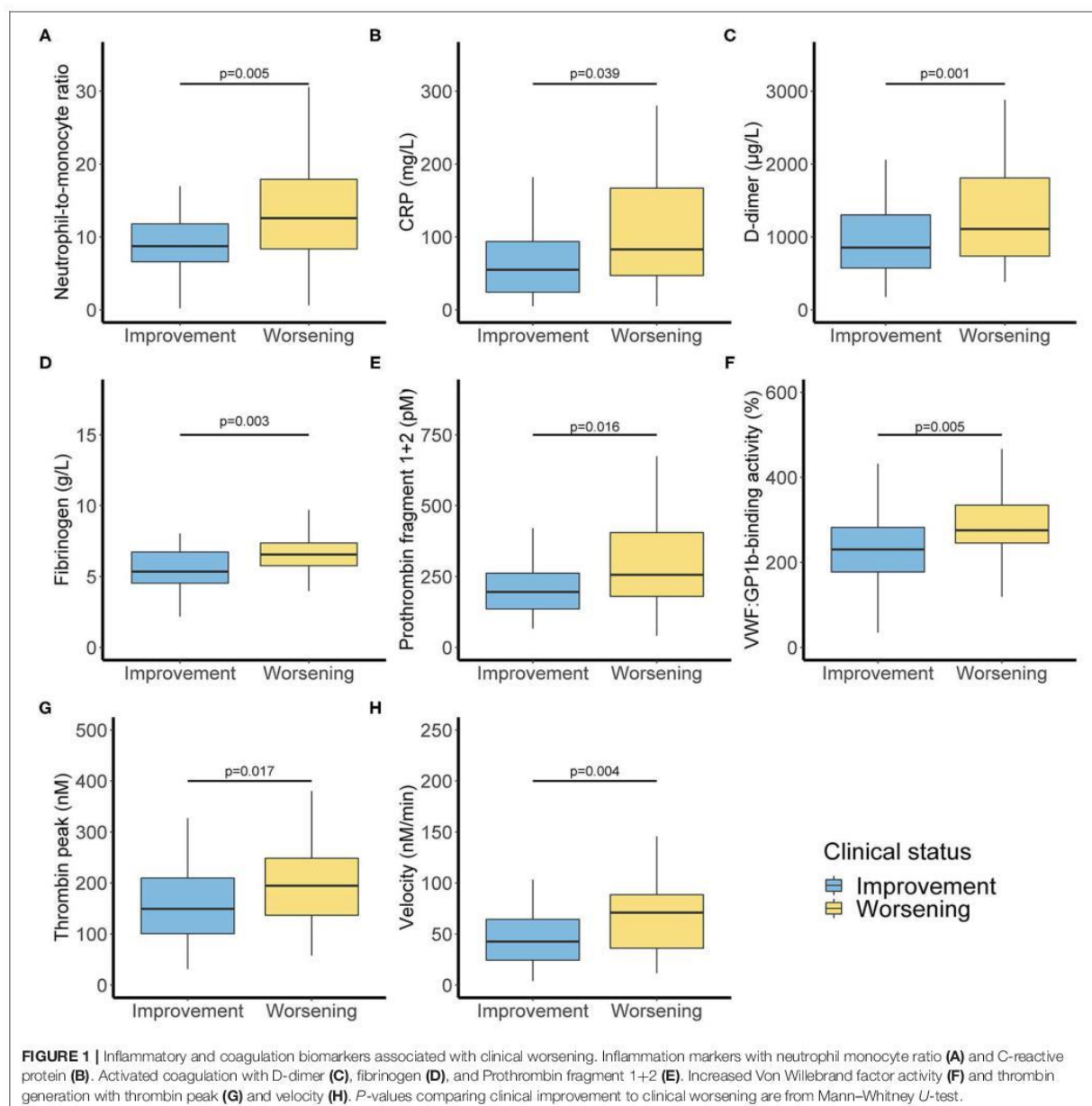
As described in section 2.5, clinical, radiological, and biological parameters were used as predictors for logistic regression analysis in order to determine predictors of clinical worsening outcome (**Table 2**). Final model of the logistic regression analysis revealed that O₂ requirement (RR = 7.27 [1.50–19.31]; $P = 0.045$), monocytes below 0.2 G/L (RR = 2.88 [1.67–3.19]; $P = 0.015$), fibrinogen levels (RR = 1.45 [1.17–1.82] per g/L increase; $P = 0.005$), prothrombin fragments 1+2 higher than 290 pM (RR = 2.39 [1.20–3.30]; $P = 0.023$), and peak of the TGA assay (RR = 1.28 [1.03–1.59] per 50 nM increase; $P = 0.043$) were associated with an increased risk of clinical worsening (**Table 2**).

Based on the predictors of the final model of the logistic regression, a classification tree was built in order to establish a hierarchical ranking of predictors to classify patients between clinical worsening and improving. Fibrinogen levels below 5.5 g/L was associated with clinical improving ($N = 35/40$, 87.5%). For patients with higher value than 5.5 g/L, a TGA peak below 99 nM is also predictive of favorable outcome ($N = 11/12$, 90.9%). Then, for patients with fibrinogen higher than 5.5 g/L and TGA peak higher than 99 nM, patients had a better clinical outcome prognosis if they did not depend on O₂ requirement when compared with patients who need it ($N = 5/6$, 83.3% and $N = 28/42$, 66.7%, respectively). This classification tree provided an accuracy of 79%, a sensitivity of 88%, a specificity of 67%, a positive predicted value of 78%, and a negative predicted value of 80% (**Figure 2**).

TABLE 1 | Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of the 99 hospitalized patients with COVID-19 infection.

Parameters	All (n = 99)	Improving (n = 64)	Worsening (n = 35)	P-value
Age, years	65 [51.5–75.0]	63 [48.8–74.3]	71 [59.0–76.0]	0.044
Male	53 (54%)	30	23	0.113
Body mass index, kg/m ²	27.8 [24.0–32.0]	26.9 [23.8–31.0]	28.4 [24.5–32.8]	0.255
Underlying comorbidity				
Chronic obstructive pulmonary disease	7 (7.1%)	4 (6.3%)	3 (8.6%)	0.695
Asthma	10 (10.1%)	6 (9.4%)	4 (11.4%)	0.739
Other respiratory disease	9 (9.1%)	7 (10.9%)	2 (5.7%)	0.486
Diabetes	30 (30.3%)	16 (25.0%)	14 (40.0%)	0.186
Hypertension	52 (52.5%)	30 (46.9%)	22 (62.9%)	0.190
Chronic kidney disease (eGFR < 30 ml/min)	9 (9.1%)	5 (7.8%)	4 (11.4%)	0.717
Chronic heart failure	4 (4.1%)	2 (3.1%)	2 (5.7%)	0.613
Previous drug use				
Immunosuppressant drugs	7 (7.1%)	3 (4.7%)	4 (11.4%)	0.240
Anticoagulation				
None	53 (53.5%)	44 (68.8%)	9 (25.7%)	<0.001
Standard	25 (25.3%)	13 (20.3%)	12 (34.3%)	
Enhanced	13 (13.1%)	5 (7.8%)	8 (22.9%)	
Curative	8 (8.1%)	2 (3.1%)	6 (17.1%)	
O ₂ requirement on admission	73 (73.7%)	40 (62.5%)	33 (94.3%)	<0.001
Smoking history				
Never/Former smokers	84 (84.8%)	54 (84.4%)	30 (85.7%)	1.000
Current smokers	15 (15.2%)	10 (15.6%)	5 (14.3%)	
Hospitalization duration	12.0 [6.0–19.0]	9.0 [5.5–14.0]	18.0 [8.5–25.5]	0.002
Hospitalization delay since the onset of symptoms	7.0 [4.0–10.0]	7.0 [4.0–10.0]	6.0 [4.0–7.0]	0.195
Radiological injuries				
None	3/86 (3.5%)	2/54 (3.7%)	1/32 (3.1%)	0.009
Not suggestive	3/86 (3.5%)	3/54 (5.6%)	0/32 (0.0%)	
<10%	11/86 (12.8%)	9/54 (16.7%)	2/32 (6.3%)	
10–25%	39/86 (45.3%)	29/54 (53.7%)	10/32 (31.3%)	
25–50%	15/86 (17.4%)	5/54 (9.3%)	10/32 (31.3%)	
50–75%	13/86 (15.1%)	6/54 (11.1%)	7/32 (21.9%)	
>75%	2/86 (2.3%)	0/54 (0.0%)	2/32 (6.3%)	
Radiological condensation				
None	22/82 (26.8%)	17/52 (32.7%)	5/30 (16.7%)	0.427
Nodular	17/82 (20.7%)	10/52 (19.2%)	7/30 (23.3%)	
Linear	37/82 (45.1%)	22/52 (42.3%)	15/30 (50.0%)	
Linear and nodular	6/82 (7.3%)	3/52 (5.8%)	3/30 (10%)	
Radiological abnormalities localization				
None	10/81 (12.3%)	8/51 (15.7%)	2/30 (6.6%)	0.554
Unilateral	3/81 (3.7%)	2/51 (3.9%)	1/30 (3.3%)	
Bilateral	68/81 (84%)	41/51 (80.4%)	27/30 (90.0%)	
Thrombosis	8 (8.1%)	3 (4.7%)	5 (14.3%)	0.127
SARS-CoV-2 nucleic acid test pre-admission	81 (81.8%)	50 (78.1%)	31 (88.6%)	0.278

Data are expressed as median [IQR], n (%), or n/N (%), where N is the total number of patients with available data. Escalated anticoagulation corresponding to 4,000 UI twice a day of enoxaparin, 6,000 UI twice a day of enoxaparin if body weight > 120 kg, or 200 UI/kg of unfractionated heparin. Lymphocytes <1 G/L, monocytes <0.2 G/L, VWF, GPIIb-binding activity >250%, Prothrombin fragment 1+2 >290 pM are outside values range. P-values comparing clinical improvement to clinical worsening are from χ^2 test, Fisher's exact test, or Mann-Whitney U-test. DIC, disseminated intravascular coagulation; ISTH, international society of thrombosis and haemostasis; TGA, thrombin generation assay. Bold values are significant values.



DISCUSSION

Our study aimed to demonstrate with clinical, radiological, and hemostasis markers the association of clinical worsening in COVID-19 patients. The association between fibrinogen, thrombin peak, and O₂ requirement had a good correlation with clinical outcome of patients.

Since December 2019, several clinical and biological markers were associated with poor prognosis in COVID-19 patients.

Several studies predict the occurrence of critical illness (23–25) and mortality in COVID-19 infection (15, 26–28). Elderly, increased body mass index, hypertension (29), diabetes, and male gender (30) were demographics and associated comorbidity regularly included in the predictive score. As expected, O₂ requirement in preadmission was a predictive factor to develop worsening SARS-CoV-19. Among biological markers, increases in C-reactive protein and urea are regularly in the prognostic score. C-reactive protein can increase rapidly after

TABLE 2 | Association factors with clinical worsening (death or intensive care unit admission).

Patient characteristics	Unadjusted ^a		Logistic regression full model ^b (N = 84)		Logistic regression final model ^c (N = 84)	
	RR (95% CI)	P-value ^d	RR (95% CI)	P-value ^d	RR (95% CI)	P-value ^d
Age (per 5-year increase)	1.10 (1.01–1.19)	0.035	1.00 (0.85–1.17)	0.984		
Sex (Female)	1.67 (0.95–2.48)	0.075				
BMI (per unit increase)	1.03 (0.98–1.08)	0.261				
Chronic respiratory disease	0.82 (0.33–1.48)	0.576				
Diabetes	1.53 (0.87–2.24)	0.123				
HTA	1.53 (0.87–2.29)	0.130				
Oxygenotherapy	5.88 (2.37–11.0)	0.003	10.6 (1.87–20.39)	0.033	7.27 (1.50–19.3)	0.045
Tobacco consumption	0.93 (0.35–1.70)	0.859				
Severe radiological abnormality	2.73 (1.73–3.55)	<0.001	1.91 (0.64–3.49)	0.210		
Lymphocytes (<1 G/L)	1.64 (0.92–2.49)	0.097				
Monocytes (<0.2 G/L)	2.79 (1.60–3.22)	0.018	2.89 (1.46–3.20)	0.026	2.88 (1.67–3.19)	0.015
NL Ratio (per unit increase)	1.02 (0.98–1.06)	0.300				
NM Ratio (per unit increase)	1.03 (1.01–1.07)	0.023	0.97 (0.92–1.02)	0.219		
TCA (>1.15)	1.14 (0.61–1.77)	0.652				
D-Dimer (>1,000 µg/L)	2.12 (1.26–3.03)	0.008	1.58 (0.45–3.15)	0.419		
Fibrin monomers (>6)	1.67 (0.88–2.42)	0.102				
Fibrinogen (per unit increase)	1.32 (1.13–1.54)	0.002	1.45 (1.10–1.88)	0.020	1.45 (1.17–1.81)	0.005
VWF:GPIIb-binding activity (>250%)	2.00 (1.15–2.97)	0.021	0.64 (0.14–1.89)	0.487		
Prothrombin fragment 1+2 (>290 pM)	2.17 (1.37–2.94)	0.004	2.58 (1.23–3.46)	0.025	2.39 (1.20–3.30)	0.023
ETP (per 200 unit increase)	1.12 (0.97–1.27)	0.122				
Peak (per 50 unit increase)	1.26 (1.07–1.48)	0.008	1.58 (0.59–2.47)	0.308	1.28 (1.03–1.59)	0.043
Velocity (per 50 unit increase)	1.75 (1.28–2.20)	0.002	0.64 (0.15–2.63)	0.754		

Results are expressed as relative risk (RR) (95% confidence interval). N = 84 due to missing data for retained predictors.

^aUnivariate logistic regression analysis.

^bMultiple logistic regression analysis for variables with P-value below 0.05.

^cBackward variable selection from the full model.

^dWald test.

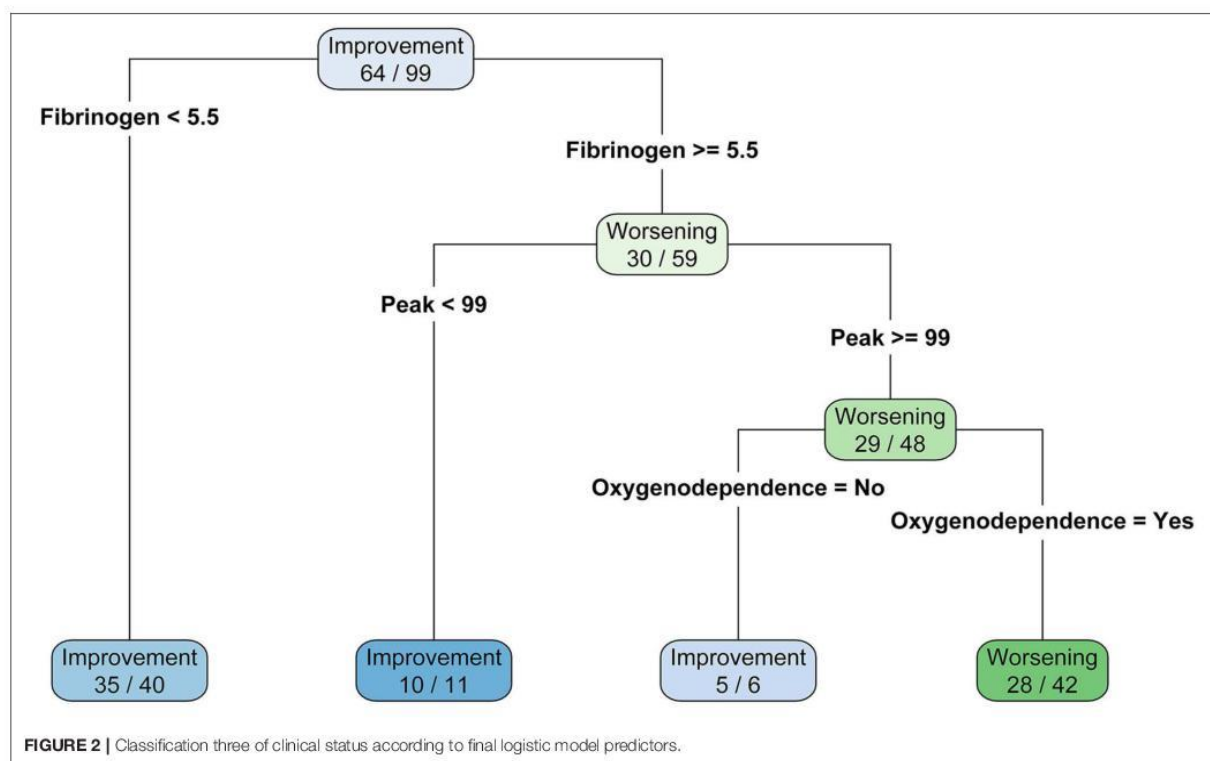
Bold values are significant values.

the onset of inflammation, cell damage, or tissue injury. The endothelium supports an extensive repertoire of natural anticoagulant. However, during sepsis, activated endothelium increase in TF expression within the vasculature is considered a pivotal step in initiating and sustaining coagulation. The concept of sepsis induced endothelial dysfunction is known as thromboinflammation (31). Few studies evaluated coagulation biomarkers to predict intensive care unit transfer and death in COVID-19. Zhang et al. (19) described an increase of D-dimer associated with poor prognosis. However, the rise of D-dimer during hospitalization is associated with a limited performance to predict death (26). In the study of He et al. (32), the D-dimer cutoff at hospital discharge or death is 2,025 µg/L (AUC: 0.909) and associated with a poor prognosis. In our study, D-dimer >2,000 was not associated with clinical worsening. However, the aim of the study was not the same, with death for He et al. Moreover, the C-reactive protein was more correlated with disease severity compared to D-dimer (33). Our results suggest that fibrinogen had a high discriminate power and a more specific manner than D-dimer does.

Prothrombin fragments 1+2 are less impacted by inflammation than D-dimer (34). We demonstrated increase

of prothrombin fragments 1+2. In a recent study evaluating prothrombin fragment 1+2 in COVID-19-associated thrombosis (35), a prothrombin fragment 1+2 >500 pmol/L was associated with venous thromboembolism (odds ratio: 4.26). Conversely, a D-dimer >2,500 ng/mL was not significantly associated with VTE (odds ratio: 5.91).

The interest of global coagulation assay has been previously demonstrated in COVID-19 (36). TGA has already been used to evaluate hypercoagulability (37–40) and acute ischemic stroke development (41). The fact that SARS-CoV-2 virus induces severe endothelial injury associated with intracellular virus and disrupted endothelial cell membranes (42) make TGA an interesting tool to predict clinical outcome of SARS-CoV-2-infected patients. Indeed, microangiopathy and occlusion of alveolar capillaries from lung patients with COVID-19 were found to be secondary to widespread vascular thrombosis (42). The monocytopenia count below 0.2 G/L could be related to COVID-19 severity. This is in accordance with the fact that a decreased monocyte count is associated with poor prognosis in sepsis (43). Recruitment of monocytes is essential for effective control and clearance of viral, bacterial, fungal, and protozoal infections (44). The inflammatory recruitment failure is also a possible explanation to aggravation.



Several studies have described DIC in some COVID-19 patients. In the study of Fogarty et al. (45), DIC was rare and appeared in the late stage disease. In two others studies (16, 46), DIC was significantly more frequent in non-survivors than in survivors. In contrast, in the 24 patients from Panigada's report (47), DIC was not evidenced. With ISTH score, we demonstrated DIC score increase with D-dimer, in worsening patients with more than 75% with a DIC score below 3. With fibrin monomer, more than 75% worsening patients had a DIC score below of 1. Furthermore, the increase of platelet and fibrinogen, associated with normal prothrombin time in our patients, explains the normal DIC score results.

The interest to predict clinical outcome in COVID-19 leads to important increases in the demand for hospital beds and shortage of medical equipment. The urgency of diagnostic and prognostic models can assist quickly the efficient triage of patients in the COVID-19 pandemic (12). Several scores exist for the prediction of mortality in pneumonia, such as CURB-65, A-DROP score, and 4C mortality score (13–15). However, these scores are not suitable to determine intensive care unit transfer. Interestingly, our results demonstrated that the association of fibrinogen level, thrombin peak measurement, and O₂ requirement was an easy-to-apply model that could predict near than 80% of clinical outcome. Of note, we observed 33/35 patients with O₂ requirement in the clinical worsening group, among which 26 had fibrinogen level higher than 5.5 g/L and TGA peak higher than 99 nM, suggesting the ability of these last two parameters to predict clinical outcome.

The interest of predictive score to worsening, including intensive care unit transfer during hospitalization, is prompt aggressive treatment, including the initiation of steroids and early escalation to critical care if appropriate (48). A recent study demonstrate that coagulation biomarkers are independent predictors of increased oxygen requirement in COVID-19 patients (49), among them increased fibrinogen and decreased FVIII/VWF:Ag ratio. A study confirmed that D-dimer increase is not associated with intensive care unit transfer (23).

In the study of Panigada et al. (47), von Willebrand factor antigen and ristocetin cofactor activities greatly increased. In the Poissy et al. study (50), factor Willebrand antigen levels seem to be associated with a greater PE risk.

Nevertheless, our study presents several limitations. We have a limited sample size, but the aim of the study was to develop an easy-to-use score to help clinicians. Moreover, our study was prospective and each patient has completed the follow up. Furthermore, we used a robust standardized coagulation test. Finally, our predictive score was computed on our total cohort since it did not appear reasonable to split the data into a training and a test dataset. The validation of our predictive score is required to ensure the reproducibility of the developed mode.

CONCLUSION

In conclusion, we identified that high fibrinogen, O₂ requirement, and thrombin peak at admission were associated with a secondary admission in intensive care unit or death.

The score allows the initiation of steroids and triage for worsening patients. Our results should therefore be considered as exploratory and deserve confirmation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional review board (person committee protection of Rouen University Hospital) and a national ethical committee (person committee protection South Mediterranean 1; Authorization protocol number: 2020-A00914-35). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PB designed the research, performed analysis, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. VL analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript. TD critically

revised the manuscript and checked the statistical methods and results. KA, MR, SM, OG, LJ, MD, GF, VB, and ME included patients and discussed the obtained results and critically revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. V. Barbay for proofreading the design of the study and the Department of Clinical Research for its help in setting up the study. We would like to acknowledge all nurses, technicians, and physicians involved in the Department of Infectious Diseases, Department of Pneumology, Department of Internal Medicine, Department of Gastroenterology and Hepatology, Department of Emergency Medicine, and intensive care unit. The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.670694/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. (2020) 395:1054–62. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3
- Guan W-J, Ni Z-Y, Hu Y, Liang W-H, Ou C-Q, He J-X, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. (2020) 382:1708–20. doi: 10.1056/NEJMoa2002032
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. (2020) 395:497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
- Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. (2020) 180:934–43. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.0994
- Wang J, Hajizadeh N, Moore EE, McIntyre RC, Moore PK, Veress LA, et al. Tissue plasminogen activator (tPA) treatment for COVID-19 associated acute respiratory distress syndrome (ARDS): a case series. *J Thromb Haemost*. (2020) 18:1752–5. doi: 10.1111/jth.14828
- Zheng Y-Y, Ma Y-T, Zhang J-Y, Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. (2020) 17:259–60. doi: 10.1038/s41569-020-0360-5
- Ji H-L, Zhao R, Matalon S, Matthay MA. Elevated plasmin(ogen) as a common risk factor for COVID-19 susceptibility. *Physiol Rev*. (2020) 100:1065–75. doi: 10.1152/physrev.00013.2020
- McDonald B, Davis RP, Kim S-J, Tse M, Esmon CT, Kolaczowska E, Jenne CN. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood*. (2017) 129:1357–67. doi: 10.1182/blood-2016-09-741298
- de Stoppelaar SF, van't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost*. (2014) 112:666–77. doi: 10.1160/TH14-02-0126
- Al-Samkari H, Karp Leaf RS, Dzik WH, Carlson JCT, Fogerty AE, Waheed A, et al. COVID-19 and coagulation: bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Blood*. (2020) 136:489–500. doi: 10.1182/blood.202006520
- Thachil J, Tang N, Gando S, Falanga A, Cattaneo M, Levi M, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost*. (2020) 18:1023–6. doi: 10.1111/jth.14810
- Wynants L, Van Calster B, Collins GS, Riley RD, Heinze G, Schuit E, et al. Prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19 infection: systematic review and critical appraisal. *BMJ*. (2020) 369:m1328. doi: 10.1136/bmj.m1328
- Miyashita N, Matsushima T, Oka M, Japanese Respiratory Society null. The JRS guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults: an update and new recommendations. *Intern Med*. (2006) 45:419–28. doi: 10.2169/internalmedicine.45.1691
- Ahn JH, Choi EY. Expanded A-DROP score: a new scoring system for the prediction of mortality in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Sci Rep*. (2018) 8:14588. doi: 10.1038/s41598-018-32750-2
- Knight SR, Ho A, Pius R, Buchan I, Carson G, Drake TM, et al. Risk stratification of patients admitted to hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: development and validation of the 4C Mortality Score. *BMJ*. (2020) 370:m3339. doi: 10.1136/bmj.m3339
- Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. (2020) 18:844–7. doi: 10.1111/jth.14768
- Zhou Y, Zhang Z, Tian J, Xiong S. Risk factors associated with disease progression in a cohort of patients infected with the 2019 novel coronavirus. *Ann Palliat Med*. (2020) 9:428–36. doi: 10.21037/apm.2020.03.26
- Kollias A, Kyriakoulis KG, Dimakakos E, Poulakou G, Stergiou GS, Syrigos K. Thromboembolic risk and anticoagulant therapy in COVID-19 patients: emerging evidence and call for action. *Br J Haematol*. (2020) 189:846–7. doi: 10.1111/bjh.16727
- Zhang L, Yan X, Fan Q, Liu H, Liu X, Liu Z, et al. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost*. (2020) 18:1324–9. doi: 10.1111/jth.14859
- Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*. (2006) 96:553–561. doi: 10.1160/TH06-07-0408
- Revel M-P, Parkar AP, Prosch H, Silva M, Sverzellati N, Gleeson F, et al. COVID-19 patients and the radiology department - advice from the European

- Society of Radiology (ESR) and the European Society of Thoracic Imaging (ESTI). *Eur Radiol.* (2020) 30:4903–9. doi: 10.1007/s00330-020-06865-y
22. Iba T, Levy JH, Warkentin TE, Thachil J, van der Poll T, Levi M, Scientific and standardization committee on DIC, and the scientific and standardization committee on perioperative and critical care of the international society on thrombosis and haemostasis. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost.* (2019) 17:1989–94. doi: 10.1111/jth.14578
 23. Hashmi MD, Alnababteh M, Vedantam K, Alunikummannil J, Oweis ES, Shorr AF. Assessing the need for transfer to the intensive care unit for Coronavirus-19 disease: epidemiology and risk factors. *Respir Med.* (2020) 174:106203. doi: 10.1016/j.rmed.2020.106203
 24. Cheng F-Y, Joshi H, Tandon P, Freeman R, Reich DL, Mazumdar M, et al. Using machine learning to predict ICU transfer in hospitalized COVID-19 patients. *J Clin Med.* (2020) 9:1668. doi: 10.3390/jcm9061668
 25. Liang W, Liang H, Ou L, Chen B, Chen A, Li C, et al. Development and validation of a clinical risk score to predict the occurrence of critical illness in hospitalized patients with COVID-19. *JAMA Intern Med.* (2020) 180:1081–9. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.2033
 26. Naymagon L, Zubizarreta N, Feld J, van Gerwen M, Alsen M, Thibaud S, et al. Admission D-dimer levels, D-dimer trends, and outcomes in COVID-19. *Thromb Res.* (2020) 196:99–105. doi: 10.1016/j.thromres.2020.08.032
 27. Allenbach Y, Saadoun D, Maalouf G, Vieira M, Hellio A, Boddaert J, et al. Development of a multivariate prediction model of intensive care unit transfer or death: a French prospective cohort study of hospitalized COVID-19 patients. *PLoS ONE.* (2020) 15:e0240711. doi: 10.1371/journal.pone.0240711
 28. Hu L, Chen S, Fu Y, Gao Z, Long H, Ren H-W, et al. Risk factors associated with clinical outcomes in 323 coronavirus disease 2019 (COVID-19) hospitalized patients in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* (2020) 71:2089–98. doi: 10.1093/cid/ciaa539
 29. Li X, Xu S, Yu M, Wang K, Tao Y, Zhou Y, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol.* (2020) 146:110–8. doi: 10.1016/j.jaci.2020.04.006
 30. Cummings MJ, Baldwin MR, Abrams D, Jacobson SD, Meyer BJ, Balough EM, et al. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet.* (2020) 395:1763–70. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31189-2
 31. Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood.* (2019) 133:906–18. doi: 10.1182/blood-2018-11-882993
 32. He X, Yao F, Chen J, Wang Y, Fang X, Lin X, et al. The poor prognosis and influencing factors of high D-dimer levels for COVID-19 patients. *Sci Rep.* (2021) 11:1830. doi: 10.1038/s41598-021-81300-w
 33. Luo X, Zhou W, Yan X, Guo T, Wang B, Xia H, et al. Prognostic value of c-reactive protein in patients with coronavirus 2019. *Clin Infect Dis.* (2020) 71:2174–9. doi: 10.1093/cid/ciaa641
 34. Lippi G, Cervellini G, Franchini M, Favaloro EJ. Biochemical markers for the diagnosis of venous thromboembolism: the past, present and future. *J Thromb Thrombolysis.* (2010) 30:459–71. doi: 10.1007/s11239-010-0460-x
 35. Al-Samkari H, Song F, Van Cott E, Kuter DJ, Rosovsky R. Evaluation of the prothrombin fragment 1.2 in patients with COVID-19. *Am J Hematol.* (2020) 95:1479–85. doi: 10.1002/ajh.25962
 36. L SB. Coagulopathie associée au COVID-19 : les éléments essentiels pour l'anesthésiste-réanimateur. *Le Prat Anesth Reanim.* (2020) 24:190–5. doi: 10.1016/j.pratan.2020.07.007
 37. Billoir P, Duflo T, Fresel M, Chrétien MH, Barbay V, Le Cam Duchez V. Thrombin generation profile in non-thrombotic factor V Leiden carriers. *J Thromb Thrombolysis.* (2019) 47:473–7. doi: 10.1007/s11239-019-01821-0
 38. Billoir P, Miranda S, Damian L, Richard V, Benhamou Y, Le Cam Duchez V. Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* (2018) 169:87–92. doi: 10.1016/j.thromres.2018.07.021
 39. Miranda S, Billoir P, Damian L, Thiebaut PA, Schapman D, Le Besnerais M, et al. Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. *PLoS ONE.* (2019) 14:e0212614. doi: 10.1371/journal.pone.0212614
 40. Billoir P, Blandinières A, Gendron N, Chocron R, Gunther S, Philippe A, et al. Endothelial colony-forming cells from idiopathic pulmonary fibrosis patients have a high procoagulant potential. *Stem Cell Rev Rep.* (2020) 17:694–9. doi: 10.1007/s12015-020-10043-4
 41. Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, Spaft C, Ducimetière P, Ritchie K, et al. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2011) 31:1445–51. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.223453
 42. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19. *N Engl J Med.* (2020) 383:120–8. doi: 10.1056/NEJMoa2015432
 43. Chung H, Lee JH, Jo YH, Hwang JE, Kim J. Circulating monocyte counts and its impact on outcomes in patients with severe sepsis including septic shock. *Shock.* (2019) 51:423–9. doi: 10.1097/SHK.0000000000001193
 44. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* (2011) 11:762–74. doi: 10.1038/nri3070
 45. Fogarty H, Townsend L, Ni Cheallaigh C, Bergin C, Martin-Loeches I, Browne P, et al. COVID19 coagulopathy in Caucasian patients. *Br J Haematol.* (2020) 189:1044–9. doi: 10.1111/bjh.16749
 46. Deng Y, Liu W, Liu K, Fang Y-Y, Shang J, Zhou L, et al. Clinical characteristics of fatal and recovered cases of coronavirus disease 2019 in Wuhan, China: a retrospective study. *Chin Med J.* (2020) 133:1261–7. doi: 10.1097/CM9.0000000000000824
 47. Panigada M, Bottino N, Tagliabue P, Grasselli G, Novembrino C, Chantarangkul V, et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: a report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. *J Thromb Haemost.* (2020) 18:1738–42. doi: 10.1111/jth.14850
 48. Group TRC. Dexamethasone in hospitalized patients with covid-19 — preliminary report. *N Engl J Med.* (2020) 384:693–704. doi: 10.1056/NEJMoa2021436
 49. Rauch A, Labreuche J, Lassalle F, Goutay J, Caplan M, Charbonnier L, et al. Coagulation biomarkers are independent predictors of increased oxygen requirements in COVID-19. *J Thromb Haemost.* (2020) 18:2942–53. doi: 10.1111/jth.15067
 50. Poissy J, Goutay J, Caplan M, Parmentier E, Duburcq T, Lassalle F, et al. Pulmonary embolism in patients with COVID-19: awareness of an increased prevalence. *Circulation.* (2020) 142:184–6. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047430

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Billoir, Alexandre, Duflo, Roger, Miranda, Gorla, Joly, Demeyere, Feugray, Brunel, Etienne and Le Cam Duchez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Table 1 supplemental. Biological characteristics of the 99 hospitalized patients with COVID-19 infection

Parameters	All (n=99)	Improving (n=64)	Worsening (n=35)	P value
Blood leukocyte count (G/L)	6.6 [4.9-9.0]	5.9 [4.9-8.6]	7.2 [4.8-9.7]	0.507
Neutrophil count (G/L)	5.0 [3.0-7.2]	4.3 [3.0-6.7]	5.5 [3.4-8.7]	0.291
Basophil count (G/L)	0.01 [0.01-0.03]	0.01 [0.01-0.03]	0.01 [0.01-0.03]	0.541
Eosinophil count (G/L)	0.00 [0.00-0.05]	0.01 [0.00-0.07]	0.00 [0.00-0.00]	0.001
Lymphocytes count (G/L)	0.91 [0.63-1.39]	1.18 [0.68-1.44]	0.81 [0.53-1.21]	0.080
<1 G/L	55/98 (56.1%)	32 (50.0%)	23/34 (67.6%)	0.134
Monocyte count (G/L)	0.41 [0.32-0.62]	0.44 [0.33-0.63]	0.36 [0.28-0.54]	0.089
<0.2 G/L	7/98 (7.1%)	1 (1.6%)	6/34 (17.6%)	0.007
Blood platelets count (G/L)	230 [155-276]	228 [155-257]	192 [161-295]	0.887
Red blood cell (T/L)	4.5 [4.1-4.9]	4.5 [4.1-4.9]	4.5 [4.1-4.9]	0.720
Haemoglobin (g/dL)	13.3 [12.0-14.4]	13.2 [11.9-14.3]	13.4 [12.2-14.5]	0.591
Neutrophil-to-Monocyte ratio	9.6 [7.4-17.2]	8.8 [6.7-12.1]	16.7 [9.0-19.8]	0.005
Neutrophil-to-Lymphocyte ratio	4.7 [2.7-7.0]	4.4 [2.5-7.5]	5.7 [3.4-11.4]	0.081
Urea (mM)	5.7 [3.9-9.8]	4.85 [-3.63-8.3]	6.8 [4.9-10.4]	0.034
C-reactive protein (mg/L)	61 [22-120]	52.5 [16.3-93.8]	74 [43-167]	0.020
Activated partial thromboplastin time ratio	1.1 [1.0-1.2]	1.1 [1.0-1.2]	1.1 [1.1-1.3]	0.124
>1.15	37/97	23/63	14/34	0.667
Prothrombin time (sec.)	13.6 [12.9-14.6]	13.5 [12.9-14.5]	13.6 [13.1-14.8]	0.393
D-dimer (µg/L)	964 [705-1861]	863 [575-1513]	1483 [890-3684]	0.001
> 500	84	52	32	0.245
> 1000	47	24	23	0.013
> 1500	34	17	17	0.047
Antithrombin (%)	103 [98-113]	104 [98-113]	101 [96-110]	0.482
Fibrin monomer	2.7 [2.0-4.4]	2.7 [2.0-3.7]	2.7 [1.9-6.2]	0.339
> 6 µg/ml	17 (17.2%)	8 (12.5%)	9 (25.7%)	0.165
Fibrinogen (g/L)	5.9 [4.8-6.9]	5.4 [4.5-5.7]	6.6 [5.8-7.4]	0.003
VWF:GPIIb-binding activity (%)	301 [149-319]	201 [140-267]	257 [182-434]	0.005
> 250 %	55 (55.6%)	30 (46.9%)	25 (71.4%)	0.032
Prothrombin fragment1+2 (pM)	261 [200-317]	235 [179-294]	277 [246-341]	0.016
> 290 pM	30 (30.3%)	13 (20.3%)	17 (48.6%)	0.007
ISTH DIC Score				
D-Dimer based Score	2 [2-3]	2 [2-2]	2 [2-3]	0.008
Fibrin monomer Score	0.00 [0.00-1.00]	0.00 [0.0-0.25]	0.00 [0.00-1.00]	0.059
TGA parameters				
Lagtime (min)	7.1 [6.3-7.2]	7.1 [6.3-9.2]	7.3 [6.7-8.8]	0.679
ETP (nM.min)	996 [774-1335]	990 [718-1237]	1132 [905-1465]	0.181
Peak (nM)	168 [112-224]	155 [101-210]	201 [137-248]	0.017
Velocity (nM/min)	53 [29-78]	45 [24-64]	68 [36-89]	0.004
Time to Peak (min)	10.8 [9.6-13.3]	10.8 [9.8-14.4]	10.4 [9.6-12.4]	0.096

Data are expressed as median [IQR], n (%), or n/N (%), where N is the total number of patients with available data. Lymphocytes<1 G/L, monocytes<0.2 G/L, VWF:GPIIb-binding activity> 250 %, Prothrombin fragment1+2> 290 pM are outside values range. P values comparing clinical improvement to clinical worsening are from χ^2 test, Fisher's exact test, or Mann-Whitney U test. DIC: disseminated intravascular coagulation ISTH: International Society Thrombosis and Haemostasis, TGA: Thrombin Generation Assay

Discussion

1. Limites du TGT

1.1. Limites préanalytiques

Le test de génération de thrombine semble être un outil intéressant pour évaluer l'hypercoagulabilité dans des modèles translationnels de dysfonction endothéliale. Il faut cependant noter que l'étape pré-analytique et le manque de standardisation limitent son utilisation et en conséquence, les études comparatives entre protocoles. Dernièrement, le sous-comité de l'ISTH sur la standardisation méthodologique du TGT (363) et d'évaluation du SAPL par le TGT (364) ont donné des recommandations pour la bonne réalisation du TGT.

Les coefficients de variation (CV) intra-analyse et inter-analyse des paramètres du TGT ont été réalisés en utilisant du plasma poolé (20 essais indépendants). Les CV intra-analyse et inter-analyse étaient respectivement de 1,7 % et 9,2 % pour le temps de latence, 1,7 % et 8,6 % pour le TTP, 2,5 % et 6,8 % pour l'ETP, 4,7 % et 6,8 % pour le pic, 9,4 % et 8,8 % pour la vélocité. Les expériences ont été réalisées en double pour les contrôles et les patients. Les résultats n'ont pas été pris en compte s'il y avait une variation de >10% entre deux puits. Notre méthodologie est conforme aux recommandations de l'ISTH, sur les étapes de prélèvements, de conservations et d'analyses des échantillons. Il est à noter que le laboratoire d'hémostase vasculaire du CHU de Rouen a participé à différentes études pour tenter d'améliorer la standardisation. Dans la démarche d'amélioration de la standardisation du TGT, nous avons candidaté aux futures études méthodologiques du sous-comité de l'ISTH sur TGT et SAPL,

1.2. Limites analytiques

1.2.1. Traitements anticoagulants

1.2.1.1. Héparine non fractionnée/Héparine de bas poids moléculaire

Les cibles thérapeutiques des traitements anticoagulants vont induire une diminution, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, de la génération de thrombine. Des études *in vitro* ont démontré une diminution globale de la génération de thrombine sous HNF (365). Une corrélation significative était retrouvée entre l'intensité de l'anticoagulation et l'ETP chez les patients traités par HNF. Dans notre expérience, la

génération de thrombine est complètement inhibée lorsque les patients traités par HNF, sont dans la cible thérapeutique de l'anti-Xa (publication en cours). Des résultats récents d'études au cours de la COVID-19 ont démontré l'intérêt de nouveaux réactifs pour neutraliser l'HNF et l'HBPM *in vitro* (366). Chez des patients hospitalisés en USI, cette neutralisation permet de retrouver une hypercoagulabilité qui n'était pas présente sur de précédentes études (367). Cette méthode pourrait avoir un intérêt sur une étude monocentrique que nous avons menée au cours de l'hospitalisation et l'aggravation en USI chez les patients COVID-19, où le TGT a été réalisé sans neutralisation de l'HNF et l'HBPM (Figure 19).

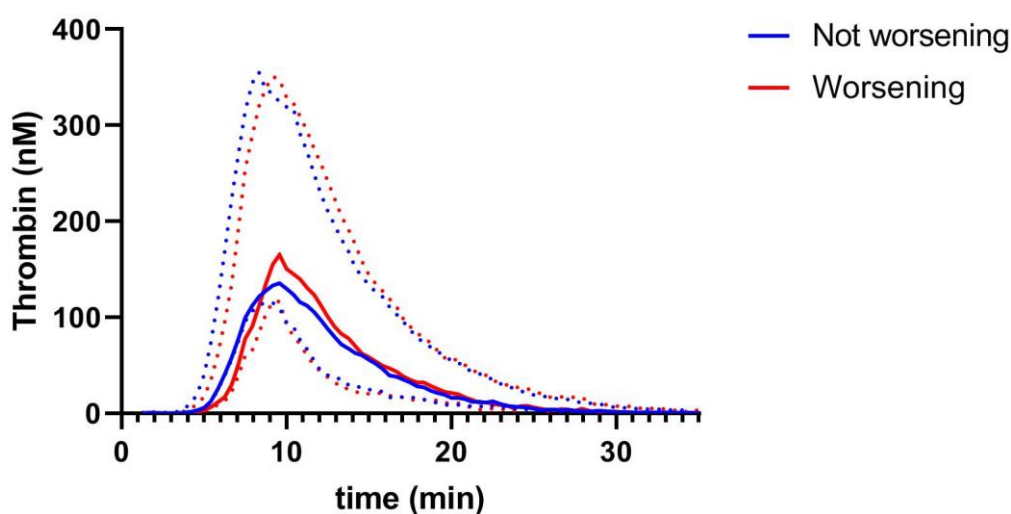


Figure 19. Résultats du TGT de l'étude COVIDTHELIUM. Comparaison entre les patients qui s'aggravent et ceux qui ne s'aggravent pas.

1.2.1.2. Anticoagulant oraux

Les anticoagulants oraux directs sont devenus le traitement de référence dans la fibrillation atriale (368) et la maladie thrombo-embolique veineuse (369). Les cibles thérapeutiques induisent une diminution de la génération de thrombine (370–372). Les études de pharmacodynamie ont démontré une affinité moindre de l'apixaban pour le facteur Xa que le rivaroxaban (373). La diminution de génération de thrombine n'est cependant pas corrélée aux concentrations plasmatiques d'AOD (374). La méthode de neutralisation actuelle, utilisée initialement pour rechercher le lupus anticoagulant, induit une augmentation de génération de thrombine *in vitro*, en antagonisant l'AOD (375). De nouvelles méthodes de neutralisation sont nécessaires pour évaluer le TGT chez les patients traités par AOD.

1.2.2. Protéine C activée

L'absence de thrombomoduline et d'EPCR induit *in vitro* l'absence d'évaluation de la résistance à la protéine C activée par le TGT, limitant l'évaluation globale de la coagulation (376). L'ajout de PCa permet de cliver directement le FVa et le FVIIIa, sans prendre en compte la PS et la PC présentes dans le plasma du patient. Cette méthode a été utilisée dans le SAPL sur plasma pauvre en plaquettes et plasma riche en plaquettes (96). De nouveaux réactifs, contenant de la thrombomoduline, permettent d'évaluer globalement la coagulation dans les sur-risques de maladie thromboembolique (377).

2. Comparaison avec les autres marqueurs d'hypercoagulabilités

2.1. D-dimères

Les D-dimères ont une excellente valeur prédictive négative pour la MTEV. Cependant, de nombreuses situations induisent une augmentation physiologique (378) et pathologique des D-dimères (379,380), ne permettant pas une utilisation optimale pour prédire le risque de MTEV. Les résultats de HERDOO2, sur le risque de récurrence thrombotique après arrêt du traitement anticoagulant, a démontré un intérêt pour la femme jeune (381). Récemment, une étude du suivi des D-dimères, après arrêt du traitement anticoagulant, a démontré que le risque de récurrence était associé au doublement des taux de D-dimères entre 3 semaines et 3 mois (OR : 1,4 (1,06-1,84)) (382). Cependant, une étude de validation du score de Vienne (prédiction du risque de récurrence thrombotique, associant l'âge, le sexe, la localisation du premier événement thrombotique et le dosage des D-dimères) démontrent une sous-estimation du risque de récurrence thrombotique (383). Les D-dimères perdent aussi en spécificité dans la prédiction des récurrences thrombotiques dans les cancers à fort risque thrombotiques (384).

Différentes études ont évalué à la fois les D-dimères et le TGT comme marqueurs prédictifs d'hypercoagulabilité. Une étude a évalué l'évolution des D-dimères et du TGT au cours du diagnostic et suivi de patients atteints de cancers solides, et développant un événement thromboembolique (385). Les D-dimères étaient significativement augmentés à l'inclusion, chez ceux développant une MTEV. Les résultats du TGT étaient paradoxaux, avec une diminution du pic et de l'ETP à l'inclusion pour ceux développant une MTEV. Au cours du suivi, les patients ayant une diminution du lag time ont développé une MTEV.

Chez les patients souffrant de coronaropathie, les D-dimères sont augmentés, et le TGT est diminué (386). Cependant, les D-dimères perdent en spécificité pour le diagnostic de la sévérité de la coronaropathie. L'association du pic de thrombine < 238 nM (se : 55,7% ; sp : 91,4%) et d'un ETP < 1623 nM.min (se : 86,9% sp : 42,9%) est un bon compromis pour prédire le risque d'évènement vasculaire au cours de la coronaropathie. Il faut cependant noter que les conditions de dosage de la TGT ne sont pas celles que nous utilisons pour l'exploration de l'hypercoagulabilité.

Dans une étude portant sur le sujet > 70 ans, l'association des 2 paramètres est un bon compromis pour prédire le risque de développer une MTEV (387). Des D-dimères > 848 ng/ml (OR : 7,7 (4,0-14,8)), un pic de thrombine > 125 nM (OR : 7,8 (4,0-15,0)) et une ETP > 1381 nM.min (9,1 (4,4-18,9)) étaient associés à un risque de développer une première MTEV. En analyse multivariée, l'association des D-dimères et du pic/ou ETP, permettait d'obtenir un OR de 7,5 (4,2-13,4) et 6,8 (3,9-11,9).

Les D-dimères restent un excellent marqueur prédictif négatif. Ils ont une meilleure sensibilité dans les pathologies artérielles pour refléter l'hypercoagulabilité. La place du TGT pourrait être utile dans les études où les D-dimères sont augmentés de façon pathologiques.

2.2. Fragments 1+2 de la prothrombine

Les F1+2 reflètent *in vivo* la génération de thrombine. Les F1+2 sont moins impactés par l'inflammation que les D-dimères (388). Ils ont été peu étudiés dans la récurrence thrombotique (389).

Des études ont comparé les F1+2, D-dimères et le TGT. Au cours de la suspicion de MTEV, les D-dimères et les F1+2 sont plus augmentés chez les patients avec suspicion de MTEV, et l'ETP et à la limite de significativité (390). Après ajustement sur l'âge, le sexe et les comorbidités, l'augmentation de l'ETP semble être le seul marqueur retrouvé dans la MTEV.

L'association F1+2 et ETP a été évaluée chez des patients développant un SCA (278). Les 2 marqueurs étaient associés à la récurrence du SCA et au décès. Dans l'étude, les F1+2 étaient augmentés et l'ETP diminué. Après ajustement des covariables, seul l'ETP était prédictif d'un « outcome » péjoratif. Ces résultats ont déjà été observés dans une autre étude sur le risque de développer un évènement cardiovasculaire (276). Une possible explication est l'hyperexpression du TFPI chez les patients présentant un SCA (391), qui est un régulateur majeur du TGT.

Une des limites des différents marqueurs d'hypercoagulabilité est la grossesse. Les résultats des différents marqueurs (F1+2, D-dimères et TGT), au cours de la grossesse normale ou à risque thrombotique, démontrent une augmentation sans prédiction du risque thrombotique (392,393).

Le TGT semble avoir des limites sur les maladies artérielles, avec une diminution associée à des événements cardiovasculaires. Les F1+2 ont été peu étudiés, mais aurait peut-être leur place avec le nouveau kit unitaire à l'étude, permettant un résultat aussi rapide que les D-dimères.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse avait pour objectif principal d'évaluer le lien entre dysfonction endothéliale et hypercoagulabilité dans différents modèles translationnels. Nos modèles avaient pour objectif de mimer trois types de dysfonctions endothéliales : aiguë (COVID-19), subaiguë (SAPL) et chronique (fibrose pulmonaire idiopathique). De notre expérience sur le TGT, l'évaluation du pic thrombine semble adapté à des pathologies "aigües", où les systèmes inhibiteurs de la coagulation sont débordés et ne régulent plus la génération de thrombine. L'ETP semble intéressant dans un contexte d'activation chronique de la coagulation, et il serait intéressant à l'avenir de compléter toute analyse avec de la thromboduline, reflétant pleinement la coagulation.

Dans notre modèle translationnel de SAPL, nous avons pu montrer l'intérêt d'utiliser le TGT pour évaluer la modulation pharmacologique par l'HCQ. Cette étude sera poursuivie dans l'essai clinique randomisé, porté par le Service de Médecine Interne, par le Dr Sébastien Miranda (APLAQUINE NCT02595346). D'autres pistes thérapeutiques pourraient être explorées dans le syndrome des antiphospholipides, comme l'utilisation pharmacologique d'inhibiteur des protease activated receptor. Un deuxième objectif était l'apprentissage de la culture d'ECFC et leur évaluation dans un modèle de dysfonction endothéliale. Dans le modèle d'ECFC FPI, nous avons pu décrire un état d'hypercoagulabilité, ce qui se traduit en clinique par des événements thrombotiques chez ces patients. La culture d'ECFC pourrait être utilisée pour évaluer si la dysfonction endothéliale retrouvée dans le SAPL se fait dès le stade du progéniteur endothélial. Cette meilleure compréhension permettrait d'ouvrir un nouvel axe thérapeutique dans le SAPL, avec une meilleure connaissance physiopathologique, permettant de classer les patients à fort risque de récurrence thrombotique, nécessitant une anticoagulation au long cours, et ceux avec un faible risque.

Enfin, nous avons pu démontrer l'intérêt du TGT dans l'infection à SarS-CoV-2 pour prédire les risques d'aggravation dès l'hospitalisation. L'intérêt de cette prédiction est d'initier chez les patients, susceptibles de s'aggraver, des thérapeutiques, tel que les corticoïdes, pour permettre de ne pas saturer les unités de soins intensifs.

Références bibliographiques

1. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Epell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*. 15 oct 1996;88(8):2939-50.
2. Roux E, Bougaran P, Dufourcq P, Couffinhal T. Fluid Shear Stress Sensing by the Endothelial Layer. *Front Physiol*. 2020;11:861.
3. Pierce RW, Giuliano JS, Pober JS. Endothelial Cell Function and Dysfunction in Critically Ill Children. *Pediatrics*. juill 2017;140(1).
4. Houde M, Desbiens L, D'Orléans-Juste P. Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv Pharmacol San Diego Calif*. 2016;77:143-75.
5. Lau KE, Lui F. Physiology, Prostaglandin I2. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cité 20 oct 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562273/>
6. Ashraf MA, Nookala V. Biochemistry, Platelet Activating Factor. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cité 20 oct 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557392/>
7. Li R, Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *J Thromb Haemost JTH*. avr 2013;11(4):605-14.
8. Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am*. févr 2007;21(1):1-11.
9. De Raucourt E, Bauduer F, Pan-Petesh B, Goudemand J. Déficit en facteur XI. *Hematologie*. 2010 ; 16:284-92.
10. Nakagaki T, Foster DC, Berkner KL, Kisiel W. Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII. *Biochemistry*. 12 nov 1991;30(45):10819-24.
11. Willis Fox O, Preston RJS. Molecular basis of protease-activated receptor 1 signaling diversity. *J Thromb Haemost JTH*. 24 sept 2019;e14643.
12. Siebenlist KR, Mosesson MW, Hernandez I, Bush LA, Di Cera E, Shainoff JR, et al. Studies on the basis for the properties of fibrin produced from fibrinogen-containing gamma' chains. *Blood*. 15 oct 2005;106(8):2730-6.
13. Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)--how does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann Med*. 2006;38(6):378-88.
14. Yuan H-Q, Hao Y-M, Ren Z, Gu H-F, Liu F-T, Yan B-J, et al. Tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. avr 2019;491:97-102.
15. Esmon NL, Owen WG, Esmon CT. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem*. 25 janv 1982;257(2):859-64.
16. Ito T, Thachil J, Asakura H, Levy JH, Iba T. Thrombomodulin in disseminated intravascular coagulation and other critical conditions-a multi-faceted anticoagulant protein with therapeutic potential. *Crit Care Lond Engl*. 15 2019;23(1):280.
17. Amiral J, Seghatchian J. Revisiting the activated protein C-protein S-thrombomodulin ternary pathway: Impact of new understanding on its laboratory investigation. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. août 2019;58(4):538-44.

18. Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, et al. Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature*. 30 mars 2000;404(6777):518-25.
19. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. sept 2003;196(3):430-43.
20. Urano T, Castellino FJ, Suzuki Y. Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin. *J Thromb Haemost JTH*. 20 mai 2018;
21. Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res*. 2004;114(5-6):321-7.
22. Bres EE, Faissner A. Low Density Receptor-Related Protein 1 Interactions With the Extracellular Matrix: More Than Meets the Eye. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:31.
23. Urano T, Suzuki Y, Iwaki T, Sano H, Honkura N, Castellino FJ. Recognition of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 as the Primary Regulator of Fibrinolysis. *Curr Drug Targets*. 2019;20(16):1695-701.
24. Plug T, Meijers JCM. Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost JTH*. avr 2016;14(4):633-44.
25. Pons S, Arnaud M, Loiselle M, Arrii E, Azoulay E, Zafrani L. Immune Consequences of Endothelial Cells' Activation and Dysfunction During Sepsis. *Crit Care Clin*. avr 2020;36(2):401-13.
26. Gerhardt T, Ley K. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res*. 1 août 2015;107(3):321-30.
27. Sundd P, Pospieszalska MK, Ley K. Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings. *Mol Immunol*. août 2013;55(1):59-69.
28. Pircher J, Engelmann B, Massberg S, Schulz C. Platelet-Neutrophil Crosstalk in Atherothrombosis. *Thromb Haemost*. août 2019;119(8):1274-82.
29. Bui TM, Wiesolek HL, Sumagin R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol*. 17 mars 2020;
30. Otani T, Furuse M. Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends Cell Biol*. 2020;30(10):805-17.
31. Pohl U. Connexins: Key Players in the Control of Vascular Plasticity and Function. *Physiol Rev*. 01 2020;100(2):525-72.
32. Rafii S, Heissig B, Hattori K. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther*. mai 2002;9(10):631-41.
33. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 14 févr 1997;275(5302):964-7.
34. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. août 2004;10(8):858-64.
35. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. sept 1996;16(9):4604-13.
36. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 20 janv 2004;109(2):220-6.

37. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 1 juill 2003;107(25):3152-8.
38. Chopra H, Hung MK, Kwong DL, Zhang CF, Pow EHN. Insights into Endothelial Progenitor Cells: Origin, Classification, Potentials, and Prospects. *Stem Cells Int*. 2018;2018:9847015.
39. Li W, Du D-Y, Liu Y, Jiang F, Zhang P, Li Y-T. Long-term nicotine exposure induces dysfunction of mouse endothelial progenitor cells. *Exp Ther Med*. janv 2017;13(1):85-90.
40. Wu Y, Wang Q, Cheng L, Wang J, Lu G. Effect of oxidized low-density lipoprotein on survival and function of endothelial progenitor cell mediated by p38 signal pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. févr 2009;53(2):151-6.
41. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. août 2001;108(3):391-7.
42. Van Belle E, Rivard A, Chen D, Silver M, Bunting S, Ferrara N, et al. Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines. *Circulation*. 21 oct 1997;96(8):2667-74.
43. Duan J, Murohara T, Ikeda H, Katoh A, Shintani S, Sasaki K, et al. Hypercholesterolemia inhibits angiogenesis in response to hindlimb ischemia: nitric oxide-dependent mechanism. *Circulation*. 7 nov 2000;102(19 Suppl 3):III370-376.
44. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, Dignat-George F, Melero-Martin JM, Khosrotehrani K, et al. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(5):1316-20.
45. Smadja DM, Melero-Martin JM, Eikenboom J, Bowman M, Sabatier F, Randi AM. Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *J Thromb Haemost JTH*. juill 2019;17(7):1190-4.
46. Vink H, Duling BR. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res*. sept 1996;79(3):581-9.
47. Megens RTA, Reitsma S, Schiffers PHM, Hilgers RHP, De Mey JGR, Slaaf DW, et al. Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution. *J Vasc Res*. 2007;44(2):87-98.
48. Liu H-Q, Li J, Xuan C-L, Ma H-C. A review on the physiological and pathophysiological role of endothelial glycocalyx. *J Biochem Mol Toxicol*. 13 juill 2020;e22571.
49. Wiesinger A, Peters W, Chappell D, Kentrup D, Reuter S, Pavenstädt H, et al. Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis. *PLoS One*. 2013;8(11):e80905.
50. Jedlicka J, Becker BF, Chappell D. Endothelial Glycocalyx. *Crit Care Clin*. avr 2020;36(2):217-32.
51. Gando S, Wada T. Disseminated intravascular coagulation in cardiac arrest and resuscitation. *J Thromb Haemost JTH*. 2019;17(8):1205-16.
52. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JBL, Kastelein JJP, Stroes ESG. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol*. oct 2005;16(5):507-11.
53. Pan L, Hong Z, Yu L, Gao Y, Zhang R, Feng H, et al. Shear stress induces human aortic endothelial cell apoptosis via interleukin-1 receptor-associated kinase 2-induced endoplasmic reticulum stress. *Mol Med Rep*. nov 2017;16(5):7205-12.

54. Maamoun H, Abdelsalam SS, Zeidan A, Korashy HM, Agouni A. Endoplasmic Reticulum Stress: A Critical Molecular Driver of Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disturbances Associated with Diabetes. *Int J Mol Sci.* 3 avr 2019;20(7).
55. Warboys CM, de Luca A, Amini N, Luong L, Duckles H, Hsiao S, et al. Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mai 2014;34(5):985-95.
56. Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* déc 2015;26(6):673-85.
57. Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol Ther.* mars 2015;147:123-35.
58. Morris G, Puri BK, Olive L, Carvalho A, Berk M, Walder K, et al. Endothelial dysfunction in neuroprogressive disorders-causes and suggested treatments. *BMC Med.* 19 oct 2020;18(1):305.
59. Oikonomou E, Leopoulou M, Theofilis P, Antonopoulos AS, Siasos G, Latsios G, et al. A link between inflammation and thrombosis in atherosclerotic cardiovascular diseases: Clinical and therapeutic implications. *Atherosclerosis.* 2020;309:16-26.
60. Owens AP, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res.* 13 mai 2011;108(10):1284-97.
61. Aleman MM, Gardiner C, Harrison P, Wolberg AS. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability. *J Thromb Haemost JTH.* nov 2011;9(11):2251-61.
62. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 1 sept 2005;106(5):1604-11.
63. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med.* 2 juin 2003;197(11):1585-98.
64. Nieman MT. Protease-activated receptors in hemostasis. *Blood.* 14 juill 2016;128(2):169-77.
65. Ludeman MJ, Kataoka H, Srinivasan Y, Esmon NL, Esmon CT, Coughlin SR. PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. *J Biol Chem.* 1 avr 2005;280(13):13122-8.
66. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science.* 7 juin 2002;296(5574):1880-2.
67. Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernández JA, et al. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron.* 19 févr 2004;41(4):563-72.
68. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost JTH.* août 2005;3(8):1800-14.
69. Li Z, Yin M, Zhang H, Ni W, Pierce RW, Zhou HJ, et al. BMX Represses Thrombin-PAR1-Mediated Endothelial Permeability and Vascular Leakage During Early Sepsis. *Circ Res.* 14 févr 2020;126(4):471-85.
70. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med.* 7 mars 2002;346(10):752-63.
71. Edwards CJ, Hughes GRV. Hughes syndrome (the antiphospholipid syndrome): 25 years old. *Mod Rheumatol.* 2008;18(2):119-24.

72. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost JTH*. févr 2006;4(2):295-306.
73. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun*. sept 2000;15(2):145-51.
74. Cervera R, Piette J-C, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. avr 2002;46(4):1019-27.
75. Cervera R, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, Kiss E, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 5-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis*. sept 2009;68(9):1428-32.
76. Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, Cervera R, Hualde L, Shoenfeld Y, de Ramón E, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis*. juin 2015;74(6):1011-8.
77. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet Lond Engl*. 30 oct 2010;376(9751):1498-509.
78. Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Sáez-Comet L, Lefkou E, Mekinian A, et al. The European Registry on Obstetric Antiphospholipid Syndrome (EUROAPS): A survey of 1000 consecutive cases. *Autoimmun Rev*. avr 2019;18(4):406-14.
79. Girón-González JA, García del Río E, Rodríguez C, Rodríguez-Martorell J, Serrano A. Antiphospholipid syndrome and asymptomatic carriers of antiphospholipid antibody: prospective analysis of 404 individuals. *J Rheumatol*. août 2004;31(8):1560-7.
80. Ruffatti A, Del Ross T, Ciprian M, Bertero MT, Sciascia S, Salvatore S, et al. Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers: a prospective multicentre follow-up study. *Ann Rheum Dis*. juin 2011;70(6):1083-6.
81. Arnaud L, Mathian A, Devilliers H, Ruffatti A, Tektonidou M, Forastiero R, et al. Patient-level analysis of five international cohorts further confirms the efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies. *Autoimmun Rev*. mars 2015;14(3):192-200.
82. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Testa S, Fierro T, Marongiu F, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood*. 27 oct 2011;118(17):4714-8.
83. Urbanus RT, Siegerink B, Roest M, Rosendaal FR, de Groot PG, Algra A. Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women in the RATIO study: a case-control study. *Lancet Neurol*. nov 2009;8(11):998-1005.
84. de Laat B, van Berkel M, Urbanus RT, Siregar B, de Groot PG, Gebbink MF, et al. Immune responses against domain I of $\beta(2)$ -glycoprotein I are driven by conformational changes: domain I of $\beta(2)$ -glycoprotein I harbors a cryptic immunogenic epitope. *Arthritis Rheum*. déc 2011;63(12):3960-8.
85. van Os GMA, Meijers JCM, Agar Ç, Seron MV, Marquart JA, Åkesson P, et al. Induction of anti- $\beta(2)$ -glycoprotein I autoantibodies in mice by protein H of *Streptococcus pyogenes*. *J Thromb Haemost JTH*. déc 2011;9(12):2447-56.

86. Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B, Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost JTH*. 2018;16(4):809-13.
87. Reynaud Q, Lega J-C, Mismetti P, Chapelle C, Wahl D, Cathébras P, et al. Risk of venous and arterial thrombosis according to type of antiphospholipid antibodies in adults without systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev*. juin 2014;13(6):595-608.
88. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. juin 2005;93(6):1147-52.
89. Saito M, Makino Y, Inoue K, Watanabe Y, Hoshi O, Kubota T. Anti-DNA antibodies cross-reactive with β 2-glycoprotein I induce monocyte tissue factor through the TLR9 pathway. *Immunol Med*. 23 juill 2020;1-12.
90. Mazetto B de M, Lazarini M, Tobaldini LQ, Arantes FT, Dos Santos APR, Jacinto BC, et al. Expression of tissue factor mRNA in thrombosis associated with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Thrombolysis*. 5 juill 2020;
91. Cuadrado MJ, López-Pedrera C, Khamashta MA, Camps MT, Tinahones F, Torres A, et al. Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: a pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum*. mai 1997;40(5):834-41.
92. López-Pedrera C, Buendía P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aguirre MA, Barbarroja N, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum*. janv 2006;54(1):301-11.
93. Prinz N, Clemens N, Canisius A, Lackner KJ. Endosomal NADPH-oxidase is critical for induction of the tissue factor gene in monocytes and endothelial cells. Lessons from the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. mars 2013;109(3):525-31.
94. Hollerbach A, Müller-Calleja N, Canisius A, Orning C, Lackner KJ. Induction of tissue factor expression by anti- β 2-glycoprotein I is mediated by tumor necrosis factor α . *J Thromb Thrombolysis*. févr 2020;49(2):228-34.
95. Müller-Calleja N, Hollerbach A, Ritter S, Pedrosa DG, Strand D, Graf C, et al. Tissue factor pathway inhibitor primes monocytes for antiphospholipid antibody-induced thrombosis. *Blood*. 3 oct 2019;134(14):1119-31.
96. Regnault V, Béguin S, Wahl D, de Maistre E, Coenraad Hemker H, Lecompte T. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost*. févr 2003;89(2):208-12.
97. Pontara E, Cattini MG, Cheng C, Bison E, Denas G, Pengo V. Insight into the hypercoagulable state of high-risk thrombotic APS patients: Contribution of a β 2GPI and aPS/PT antibodies. *J Thromb Haemost JTH*. 29 nov 2020;
98. Krikun G, Lockwood CJ, Wu XX, Zhou XD, Guller S, Calandri C, et al. The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immunolocalization and in vitro regulation. *Placenta*. sept 1994;15(6):601-12.
99. Rand JH, Wu X-X, Quinn AS, Ashton AW, Chen PP, Hathcock JJ, et al. Hydroxychloroquine protects the annexin A5 anticoagulant shield from disruption by antiphospholipid antibodies: evidence for a novel effect for an old antimalarial drug. *Blood*. 18 mars 2010;115(11):2292-9.
100. Jacobsen EM, Sandset PM, Wisløff F. Lupus anticoagulant and a functional assay for tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res*. 15 août 1996;83(4):339-40.
101. Jacobsen EM, Sandset PM, Wisløff F. Do antiphospholipid antibodies interfere with tissue factor pathway inhibitor? *Thromb Res*. 15 mai 1999;94(4):213-20.

102. Wolberg AS, Roubey RAS. Mechanisms of autoantibody-induced monocyte tissue factor expression. *Thromb Res.* 2004;114(5-6):391-6.
103. Liestøl S, Sandset PM, Jacobsen EM, Mowinckel M-C, Wisløff F. Decreased anticoagulant response to tissue factor pathway inhibitor type 1 in plasmas from patients with lupus anticoagulants. *Br J Haematol.* janv 2007;136(1):131-7.
104. Ames PR, Tommasino C, Iannaccone L, Brillante M, Cimino R, Brancaccio V. Coagulation activation and fibrinolytic imbalance in subjects with idiopathic antiphospholipid antibodies--a crucial role for acquired free protein S deficiency. *Thromb Haemost.* août 1996;76(2):190-4.
105. Atsumi T, Khamashta MA, Andujar C, Leandro MJ, Amengual O, Ames PR, et al. Elevated plasma lipoprotein(a) level and its association with impaired fibrinolysis in patients with antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* janv 1998;25(1):69-73.
106. Li XN, Grenett HE, Benza RL, Demissie S, Brown SL, Tabengwa EM, et al. Genotype-specific transcriptional regulation of PAI-1 expression by hypertriglyceridemic VLDL and Lp(a) in cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* nov 1997;17(11):3215-23.
107. Yang C-D, Hwang K-K, Yan W, Gallagher K, FitzGerald J, Grossman JM, et al. Identification of anti-plasmin antibodies in the antiphospholipid syndrome that inhibit degradation of fibrin. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mai 2004;172(9):5765-73.
108. Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Matsuura E, Kobayashi K, Inagaki J, et al. Nicked beta2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood.* 15 mai 2004;103(10):3766-72.
109. Grosso G, Vikerfors A, Woodhams B, Adam M, Bremme K, Holmström M, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) - A possible link between coagulation and complement activation in the antiphospholipid syndrome (APS). *Thromb Res.* oct 2017;158:168-73.
110. Celińska-Lowenhoff M, Iwaniec T, Padjas A, Musiał J, Undas A. Altered fibrin clot structure/function in patients with antiphospholipid syndrome: association with thrombotic manifestation. *Thromb Haemost.* août 2014;112(2):287-96.
111. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, Thomas GD, Yuhanna IS, Girardi G, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via β 2GPI and apoER2. *J Clin Invest.* janv 2011;121(1):120-31.
112. Romay-Penabad Z, Aguilar-Valenzuela R, Urbanus RT, Derksen RHW, Pennings MTT, Papalardo E, et al. Apolipoprotein E receptor 2 is involved in the thrombotic complications in a murine model of the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 27 janv 2011;117(4):1408-14.
113. Sacharidou A, Chambliss KL, Ulrich V, Salmon JE, Shen Y-M, Herz J, et al. Antiphospholipid antibodies induce thrombosis by PP2A activation via apoER2-Dab2-SHC1 complex formation in endothelium. *Blood.* 10 mai 2018;131(19):2097-110.
114. Branch DW, Dudley DJ, Mitchell MD, Creighton KA, Abbott TM, Hammond EH, et al. Immunoglobulin G fractions from patients with antiphospholipid antibodies cause fetal death in BALB/c mice: a model for autoimmune fetal loss. *Am J Obstet Gynecol.* juill 1990;163(1 Pt 1):210-6.
115. Holers VM, Girardi G, Mo L, Guthridge JM, Molina H, Pierangeli SS, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med.* 21 janv 2002;195(2):211-20.

116. Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D, et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest.* déc 2003;112(11):1644-54.
117. Chaturvedi S, Braunstein EM, Brodsky RA. Antiphospholipid syndrome: complement activation, complement gene mutations and therapeutic implications. *J Thromb Haemost* [Internet]. [cité 11 janv 2021];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jth.15082>
118. Schmidt CQ, Schrezenmeier H, Kavanagh D. Complement and the prothrombotic state. *Blood.* 20 août 2021;blood.2020007206.
119. Faguer S, Ribes D. Early use of eculizumab for catastrophic antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 15 août 2021;
120. Erkan D, Harrison MJ, Levy R, Peterson M, Petri M, Sammaritano L, et al. Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals. *Arthritis Rheum.* juill 2007;56(7):2382-91.
121. Ruiz-Irastorza G, Cuadrado MJ, Ruiz-Arruza I, Brey R, Crowther M, Derksen R, et al. Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients: report of a task force at the 13th International Congress on antiphospholipid antibodies. *Lupus.* févr 2011;20(2):206-18.
122. Zuo Y, Barbhuiya M, Erkan D. Primary Thrombosis Prophylaxis in Persistently Antiphospholipid Antibody-Positive Individuals: Where Do We Stand in 2018? *Curr Rheumatol Rep.* 10 sept 2018;20(11):66.
123. Finazzi G, Marchioli R, Brancaccio V, Schinco P, Wisloff F, Musial J, et al. A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS). *J Thromb Haemost JTH.* mai 2005;3(5):848-53.
124. Crowther MA, Ginsberg JS, Julian J, Denburg J, Hirsh J, Douketis J, et al. A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med.* 18 sept 2003;349(12):1133-8.
125. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. *Rheumatol Oxf Engl.* août 2013;52(8):1397-403.
126. Cohen H, Efthymiou M, Devreese KMJ. Monitoring of anticoagulation in thrombotic antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* [Internet]. [cité 11 janv 2021];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jth.15217>
127. Cohen H, Hunt BJ, Efthymiou M, Arachchilage DR, Mackie IJ, Clawson S, et al. Rivaroxaban versus warfarin to treat patients with thrombotic antiphospholipid syndrome, with or without systemic lupus erythematosus (RAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 2/3, non-inferiority trial. *Lancet Haematol.* 2016;3(9):e426-36.
128. Pengo V, Denas G, Zoppellaro G, Jose SP, Hoxha A, Ruffatti A, et al. Rivaroxaban vs warfarin in high-risk patients with antiphospholipid syndrome. *Blood.* 27 sept 2018;132(13):1365-71.
129. Pengo V, Hoxha A, Andreoli L, Tincani A, Silvestri E, Prisco D, et al. Trial of Rivaroxaban in AntiPhospholipid Syndrome (TRAPS): Two-year outcomes after the study closure. *J Thromb Haemost JTH.* 30 oct 2020;
130. Zuily S, Cohen H, Isenberg D, Woller SC, Crowther M, Dufrost V, et al. Use of direct oral anticoagulants in patients with thrombotic antiphospholipid syndrome: Guidance from the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost JTH.* sept 2020;18(9):2126-37.

131. Cohen H, Cuadrado MJ, Erkan D, Duarte-Garcia A, Isenberg DA, Knight JS, et al. 16th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Treatment Trends. *Lupus*. oct 2020;29(12):1571-93.
132. Cowchock S, Balaban DJ. Efficacy of prednisone treatment to prevent recurrent fetal death. *Am J Obstet Gynecol*. avr 1990;162(4):1128-9.
133. Hasegawa I, Takakuwa K, Goto S, Yamada K, Sekizuka N, Kanazawa K, et al. Effectiveness of prednisolone/ aspirin therapy for recurrent aborters with antiphospholipid antibody. *Hum Reprod Oxf Engl*. févr 1992;7(2):203-7.
134. Cowchock FS, Reece EA, Balaban D, Branch DW, Plouffe L. Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: a collaborative randomized trial comparing prednisone with low-dose heparin treatment. *Am J Obstet Gynecol*. mai 1992;166(5):1318-23.
135. Cornbleet T. Discoid lupus erythematosus treated with plaquenil. *AMA Arch Dermatol*. juin 1956;73(6):572-5.
136. Tektonidou MG, Laskari K, Panagiotakos DB, Moutsopoulos HM. Risk factors for thrombosis and primary thrombosis prevention in patients with systemic lupus erythematosus with or without antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum*. 15 janv 2009;61(1):29-36.
137. Kaiser R, Cleveland CM, Criswell LA. Risk and protective factors for thrombosis in systemic lupus erythematosus: results from a large, multi-ethnic cohort. *Ann Rheum Dis*. févr 2009;68(2):238-41.
138. Mekinian A, Costedoat-Chalumeau N, Masseau A, Tincani A, De Caroli S, Alijotas-Reig J, et al. Obstetrical APS: is there a place for hydroxychloroquine to improve the pregnancy outcome? *Autoimmun Rev*. janv 2015;14(1):23-9.
139. Ruffatti A, Tonello M, Hoxha A, Sciascia S, Cuadrado MJ, Latino JO, et al. Effect of Additional Treatments Combined with Conventional Therapies in Pregnant Patients with High-Risk Antiphospholipid Syndrome: A Multicentre Study. *Thromb Haemost*. avr 2018;118(4):639-46.
140. Kyburz D, Brentano F, Gay S. Mode of action of hydroxychloroquine in RA-evidence of an inhibitory effect on toll-like receptor signaling. *Nat Clin Pract Rheumatol*. sept 2006;2(9):458-9.
141. Borba EF, Bonfá E. Longterm beneficial effect of chloroquine diphosphate on lipoprotein profile in lupus patients with and without steroid therapy. *J Rheumatol*. avr 2001;28(4):780-5.
142. Rand JH, Wu X-X, Quinn AS, Chen PP, Hathcock JJ, Taatjes DJ. Hydroxychloroquine directly reduces the binding of antiphospholipid antibody-beta2-glycoprotein I complexes to phospholipid bilayers. *Blood*. 1 sept 2008;112(5):1687-95.
143. Nuri E, Taraborelli M, Andreoli L, Tonello M, Gerosa M, Calligaro A, et al. Long-term use of hydroxychloroquine reduces antiphospholipid antibodies levels in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Immunol Res*. févr 2017;65(1):17-24.
144. Martinson JA, Montoya CJ, Usuga X, Ronquillo R, Landay AL, Desai SN. Chloroquine modulates HIV-1-induced plasmacytoid dendritic cell alpha interferon: implication for T-cell activation. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2010;54(2):871-81.
145. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 mars 2011;183(6):788-824.
146. Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, McKeever T. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Eur Respir J*. sept 2015;46(3):795-806.

147. Raghu G, Chen S-Y, Yeh W-S, Maroni B, Li Q, Lee Y-C, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001-11. *Lancet Respir Med.* juill 2014;2(7):566-72.
148. Navaratnam V, Fogarty AW, Glendening R, McKeever T, Hubbard RB. The increasing secondary care burden of idiopathic pulmonary fibrosis: hospital admission trends in England from 1998 to 2010. *Chest.* avr 2013;143(4):1078-84.
149. Baumgartner KB, Samet JM, Coultas DB, Stidley CA, Hunt WC, Colby TV, et al. Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study. Collaborating Centers. *Am J Epidemiol.* 15 août 2000;152(4):307-15.
150. Hewson T, McKeever TM, Gibson JE, Navaratnam V, Hubbard RB, Hutchinson JP. Timing of onset of symptoms in people with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 11 oct 2017;
151. Behr J. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 30 août 2012;367(9):869; author reply 870-871.
152. Kolb M, Richeldi L, Behr J, Maher TM, Tang W, Stowasser S, et al. Nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and preserved lung volume. *Thorax.* avr 2017;72(4):340-6.
153. Albera C, Costabel U, Fagan EA, Glassberg MK, Gorina E, Lancaster L, et al. Efficacy of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis with more preserved lung function. *Eur Respir J.* sept 2016;48(3):843-51.
154. Lindell KO, Liang Z, Hoffman LA, Rosenzweig MQ, Saul MI, Pilewski JM, et al. Palliative care and location of death in decedents with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* févr 2015;147(2):423-9.
155. Collard HR, Ryerson CJ, Corte TJ, Jenkins G, Kondoh Y, Lederer DJ, et al. Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An International Working Group Report. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 août 2016;194(3):265-75.
156. Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, Waldron JA. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* janv 1997;155(1):242-8.
157. Kurashima K, Takayanagi N, Tsuchiya N, Kanauchi T, Ueda M, Hoshi T, et al. The effect of emphysema on lung function and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirol Carlton Vic.* juill 2010;15(5):843-8.
158. Ryerson CJ, Hartman T, Elicker BM, Ley B, Lee JS, Abbritti M, et al. Clinical features and outcomes in combined pulmonary fibrosis and emphysema in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* juill 2013;144(1):234-40.
159. Cottin V, Nunes H, Brillet P-Y, Delaval P, Devouassoux G, Tillie-Leblond I, et al. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J.* oct 2005;26(4):586-93.
160. Mejía M, Carrillo G, Rojas-Serrano J, Estrada A, Suárez T, Alonso D, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and emphysema: decreased survival associated with severe pulmonary arterial hypertension. *Chest.* juill 2009;136(1):10-5.
161. Kohashi Y, Arai T, Sugimoto C, Tachibana K, Akira M, Kitaichi M, et al. Clinical Impact of Emphysema Evaluated by High-Resolution Computed Tomography on Idiopathic Pulmonary Fibrosis Diagnosed by Surgical Lung Biopsy. *Respir Int Rev Thorac Dis.* 2016;92(4):220-8.
162. Ozawa Y, Suda T, Naito T, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, et al. Cumulative incidence of and predictive factors for lung cancer in IPF. *Respirol Carlton Vic.* juill 2009;14(5):723-8.

163. Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med.* janv 2000;161(1):5-8.
164. Hubbard RB, Smith C, Le Jeune I, Gribbin J, Fogarty AW. The association between idiopathic pulmonary fibrosis and vascular disease: a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 déc 2008;178(12):1257-61.
165. Dalleywater W, Powell HA, Fogarty AW, Hubbard RB, Navaratnam V. Venous thromboembolism in people with idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based study. *Eur Respir J.* déc 2014;44(6):1714-5.
166. Noth I, Anstrom KJ, Calvert SB, de Andrade J, Flaherty KR, Glazer C, et al. A placebo-controlled randomized trial of warfarin in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 juill 2012;186(1):88-95.
167. Miyake Y, Sasaki S, Yokoyama T, Chida K, Azuma A, Suda T, et al. Case-control study of medical history and idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *Respirol Carlton Vic.* sept 2005;10(4):504-9.
168. Kim W-Y, Mok Y, Kim GW, Baek S-J, Yun YD, Jee SH, et al. Association between idiopathic pulmonary fibrosis and coronary artery disease: a case-control study and cohort analysis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis Off J WASOG.* 5 janv 2015;31(4):289-96.
169. Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 mai 2014;189(10):1161-72.
170. Alder JK, Chen JJ-L, Lancaster L, Danoff S, Su S, Cogan JD, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 sept 2008;105(35):13051-6.
171. Fingerlin TE, Murphy E, Zhang W, Peljto AL, Brown KK, Steele MP, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat Genet.* juin 2013;45(6):613-20.
172. Allen RJ, Porte J, Braybrooke R, Flores C, Fingerlin TE, Oldham JM, et al. Genetic variants associated with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis in people of European ancestry: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med.* nov 2017;5(11):869-80.
173. Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 21 avr 2011;364(16):1503-12.
174. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, et al. Muc5b is required for airway defence. *Nature.* 16 janv 2014;505(7483):412-6.
175. Morris A, Gibson K, Collman RG. The lung microbiome in idiopathic pulmonary fibrosis. What does it mean and what should we do about it? *Am J Respir Crit Care Med.* 15 oct 2014;190(8):850-2.
176. Meng X-M, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* juin 2016;12(6):325-38.
177. Prud'homme GJ. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* nov 2007;87(11):1077-91.
178. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* oct 2012;13(10):616-30.
179. Zhang YE. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 févr 2017;9(2).
180. Andrianifahanana M, Wilkes MC, Gupta SK, Rahimi RA, Repellin CE, Edens M, et al. Profibrotic TGF β responses require the cooperative action of PDGF and ErbB receptor tyrosine kinases. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* nov 2013;27(11):4444-54.

181. Jung M-Y, Kang J-H, Hernandez DM, Yin X, Andrianifahanana M, Wang Y, et al. Fatty acid synthase is required for profibrotic TGF- β signaling. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* juill 2018;32(7):3803-15.
182. Smadja DM, Mauge L, Nunes H, d'Audigier C, Juvin K, Borie R, et al. Imbalance of circulating endothelial cells and progenitors in idiopathic pulmonary fibrosis. *Angiogenesis.* janv 2013;16(1):147-57.
183. Blandinières A, Gendron N, Bacha N, Bièche I, Chocron R, Nunes H, et al. Interleukin-8 release by endothelial colony-forming cells isolated from idiopathic pulmonary fibrosis patients might contribute to their pathogenicity. *Angiogenesis.* mai 2019;22(2):325-39.
184. Yin Q, Nan H-Y, Zhang W-H, Yan L-F, Cui G-B, Huang X-F, et al. Pulmonary microvascular endothelial cells from bleomycin-induced rats promote the transformation and collagen synthesis of fibroblasts. *J Cell Physiol.* août 2011;226(8):2091-102.
185. Bacha NC, Blandinieres A, Rossi E, Gendron N, Nevo N, Lecourt S, et al. Endothelial Microparticles are Associated to Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Stem Cell Rev.* avr 2018;14(2):223-35.
186. Corbel M, Caulet-Maugendre S, Germain N, Molet S, Lagente V, Boichot E. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat. *J Pathol.* avr 2001;193(4):538-45.
187. Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med.* 10 mai 2018;378(19):1811-23.
188. Fujii M, Hayakawa H, Urano T, Sato A, Chida K, Nakamura H, et al. Relevance of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor for hypercoagulable state in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thromb Res.* 15 juill 2000;99(2):111-7.
189. Navaratnam V, Fogarty AW, McKeever T, Thompson N, Jenkins G, Johnson SR, et al. Presence of a prothrombotic state in people with idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based case-control study. *Thorax.* mars 2014;69(3):207-15.
190. Wygrecka M, Kwapiszewska G, Jablonska E, von Gerlach S, Henneke I, Zakrzewicz D, et al. Role of protease-activated receptor-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juin 2011;183(12):1703-14.
191. Borensztajn K, Stiekema J, Nijmeijer S, Reitsma PH, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Pathol.* févr 2008;172(2):309-20.
192. Bogatkevich GS, Tourkina E, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem.* 30 nov 2001;276(48):45184-92.
193. Lin C, von der Thüsen J, Isermann B, Weiler H, van der Poll T, Borensztajn K, et al. High endogenous activated protein C levels attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Cell Mol Med.* nov 2016;20(11):2029-35.
194. Kotani I, Sato A, Hayakawa H, Urano T, Takada Y, Takada A. Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thromb Res.* 15 mars 1995;77(6):493-504.
195. Bertozzi P, Astedt B, Zenzius L, Lynch K, LeMaire F, Zapol W, et al. Depressed bronchoalveolar urokinase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 29 mars 1990;322(13):890-7.
196. Eitzman DT, McCoy RD, Zheng X, Fay WP, Shen T, Ginsburg D, et al. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Clin Invest.* 1 janv 1996;97(1):232-7.

197. Kubo H, Nakayama K, Yanai M, Suzuki T, Yamaya M, Watanabe M, et al. Anticoagulant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. sept 2005;128(3):1475-82.
198. Crooks MG, Hart SP. Coagulation and anticoagulation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc*. sept 2015;24(137):392-9.
199. Dowman LM, McDonald CF, Bozinovski S, Vlahos R, Gillies R, Pouniotis D, et al. Greater endurance capacity and improved dyspnoea with acute oxygen supplementation in idiopathic pulmonary fibrosis patients without resting hypoxaemia. *Respirol Carlton Vic*. juill 2017;22(5):957-64.
200. Dowman LM, McDonald CF, Hill CJ, Lee AL, Barker K, Boote C, et al. The evidence of benefits of exercise training in interstitial lung disease: a randomised controlled trial. *Thorax*. juill 2017;72(7):610-9.
201. Valapour M, Lehr CJ, Skeans MA, Smith JM, Carrico R, Uccellini K, et al. OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Lung. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. janv 2018;18 Suppl 1:363-433.
202. Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. mai 2015;45(5):1434-45.
203. Richeldi L, Cottin V, Flaherty KR, Kolb M, Inoue Y, Raghu G, et al. Design of the INPULSIS™ trials: two phase 3 trials of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. juill 2014;108(7):1023-30.
204. Canestaro WJ, Forrester SH, Raghu G, Ho L, Devine BE. Drug Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Chest*. mars 2016;149(3):756-66.
205. Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. oct 1999;291(1):367-73.
206. Nathan SD, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glaspole I, Glassberg MK, et al. Effect of pirfenidone on mortality: pooled analyses and meta-analyses of clinical trials in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet Respir Med*. janv 2017;5(1):33-41.
207. Saggar R, Khanna D, Vaidya A, Derhovanessian A, Maranian P, Duffy E, et al. Changes in right heart haemodynamics and echocardiographic function in an advanced phenotype of pulmonary hypertension and right heart dysfunction associated with pulmonary fibrosis. *Thorax*. févr 2014;69(2):123-9.
208. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*. oct 1999;79(4):1193-226.
209. Yang J, Li X, Al-Lamki RS, Southwood M, Zhao J, Lever AM, et al. Smad-dependent and smad-independent induction of id1 by prostacyclin analogues inhibits proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Circ Res*. 23 juill 2010;107(2):252-62.
210. Lambers C, Roth M, Jaksch P, Muraközy G, Tamm M, Klepetko W, et al. Treprostinil inhibits proliferation and extracellular matrix deposition by fibroblasts through cAMP activation. *Sci Rep*. 18 janv 2018;8(1):1087.
211. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA*. 28 avr 2020;323(16):1574-81.
212. Zhang J-J, Dong X, Cao Y-Y, Yuan Y-D, Yang Y-B, Yan Y-Q, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*. 19 févr 2020;

213. Wan S, Xiang Y, Fang W, Zheng Y, Li B, Hu Y, et al. Clinical Features and Treatment of COVID-19 Patients in Northeast Chongqing. *J Med Virol.* 21 mars 2020;
214. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 16 2020;181(2):271-280.e8.
215. Ji H-L, Zhao R, Matalon S, Matthay MA. Elevated plasmin(ogen) as a common risk factor for COVID-19 susceptibility. *Physiol Rev.* 27 mars 2020;
216. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet Lond Engl.* 02 2020;395(10234):1417-8.
217. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med.* 09 2020;383(2):120-8.
218. Knight SR, Ho A, Pius R, Buchan I, Carson G, Drake TM, et al. Risk stratification of patients admitted to hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: development and validation of the 4C Mortality Score. *BMJ.* 09 2020;370:m3339.
219. Fogarty H, Townsend L, Ni Cheallaigh C, Bergin C, Martin-Loeches I, Browne P, et al. COVID19 coagulopathy in Caucasian patients. *Br J Haematol.* 2020;189(6):1044-9.
220. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost JTH.* 2020;18(4):844-7.
221. Deng Y, Liu W, Liu K, Fang Y-Y, Shang J, Zhou L, et al. Clinical characteristics of fatal and recovered cases of coronavirus disease 2019 in Wuhan, China: a retrospective study. *Chin Med J (Engl).* 5 juin 2020;133(11):1261-7.
222. Wang M, Hao H, Leeper NJ, Zhu L. Recent Highlights of ATVB Thrombotic regulation from the endothelial cell perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juin 2018;38(6):e90-5.
223. Panigada M, Bottino N, Tagliabue P, Grasselli G, Novembrino C, Chantarangkul V, et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. *J Thromb Haemost JTH.* 2020;18(7):1738-42.
224. Kuckleburg CJ, Yates CM, Kalia N, Zhao Y, Nash GB, Watson SP, et al. Endothelial cell-borne platelet bridges selectively recruit monocytes in human and mouse models of vascular inflammation. *Cardiovasc Res.* 1 juill 2011;91(1):134-41.
225. McDonald B, Davis RP, Kim S-J, Tse M, Esmon CT, Kolaczkowska E, et al. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood.* 09 2017;129(10):1357-67.
226. de Stoppelaar SF, van 't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost.* oct 2014;112(4):666-77.
227. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* avr 2020;8(4):420-2.
228. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol.* juill 2017;39(5):517-28.
229. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl.* 15 2020;395(10223):497-506.

230. Chen X, Zhao B, Qu Y, Chen Y, Xiong J, Feng Y, et al. Detectable serum SARS-CoV-2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 (IL-6) level in critically ill COVID-19 patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* [Internet]. 17 avr 2020 [cité 21 nov 2020]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7184354/>
231. Ng O-W, Chia A, Tan AT, Jadi RS, Leong HN, Bertolotti A, et al. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine*. 12 avr 2016;34(17):2008-14.
232. Vabret N, Samstein R, Fernandez N, Merad M, Sinai Immunology Review Project, Trainees, et al. Advancing scientific knowledge in times of pandemics. *Nat Rev Immunol*. juin 2020;20(6):338.
233. Group TRC. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 — Preliminary Report. *N Engl J Med* [Internet]. 17 juill 2020 [cité 26 nov 2020]; Disponible sur: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2021436>
234. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet Lond Engl*. 28 mars 2020;395(10229):1054-62.
235. Cui S, Chen S, Li X, Liu S, Wang F. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost JTH*. juin 2020;18(6):1421-4.
236. Gattinoni L, Coppola S, Cressoni M, Busana M, Rossi S, Chiumello D. COVID-19 Does Not Lead to a « Typical » Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 mai 2020;201(10):1299-300.
237. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers D a. MPJ, Kant KM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res*. 2020;191:145-7.
238. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers D, Kant KM, et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thromb Res*. juill 2020;191:148-50.
239. Llitjos J-F, Leclerc M, Chochois C, Monsallier J-M, Ramakers M, Auvray M, et al. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients. *J Thromb Haemost JTH*. juill 2020;18(7):1743-6.
240. Poissy J, Goutay J, Caplan M, Parmentier E, Duburcq T, Lassalle F, et al. Pulmonary Embolism in Patients With COVID-19: Awareness of an Increased Prevalence. *Circulation*. 14 2020;142(2):184-6.
241. Lodigiani C, Iapichino G, Carenzo L, Cecconi M, Ferrazzi P, Sebastian T, et al. Venous and arterial thromboembolic complications in COVID-19 patients admitted to an academic hospital in Milan, Italy. *Thromb Res*. 2020;191:9-14.
242. Bradley P, Frost F, Tharmaratnam K, Wootton DG, NW Collaborative Organisation for Respiratory Research. Utility of established prognostic scores in COVID-19 hospital admissions: multicentre prospective evaluation of CURB-65, NEWS2 and qSOFA. *BMJ Open Respir Res*. déc 2020;7(1).
243. Dai M, Liu D, Liu M, Zhou F, Li G, Chen Z, et al. Patients with Cancer Appear More Vulnerable to SARS-CoV-2: A Multicenter Study during the COVID-19 Outbreak. *Cancer Discov*. 2020;10(6):783-91.
244. Li Y, Xia L. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Role of Chest CT in Diagnosis and Management. *AJR Am J Roentgenol*. juin 2020;214(6):1280-6.
245. Liang W, Liang H, Ou L, Chen B, Chen A, Li C, et al. Development and Validation of a Clinical Risk Score to Predict the Occurrence of Critical Illness in Hospitalized Patients With COVID-19. *JAMA Intern Med*. 01 2020;180(8):1081-9.

246. Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol.* févr 1953;6(1):3-8.
247. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost.* nov 2006;96(5):553-61.
248. Dargaud Y, Wolberg AS, Luddington R, Regnault V, Spronk H, Baglin T, et al. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study. *Thromb Res.* déc 2012;130(6):929-34.
249. Berntorp E, Salvagno GL. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. *Semin Thromb Hemost.* oct 2008;34(7):670-82.
250. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thromb J.* 26 oct 2005;3:16.
251. Favaloro EJ, Franchini M, Lippi G. Aging hemostasis: changes to laboratory markers of hemostasis as we age - a narrative review. *Semin Thromb Hemost.* sept 2014;40(6):621-33.
252. Haas FJLM, Schutgens REG, Kluft C, Biesma DH. A thrombin generation assay may reduce the need for compression ultrasonography for the exclusion of deep venous thrombosis in the elderly. *Scand J Clin Lab Invest.* févr 2011;71(1):12-8.
253. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health.* 25 mars 2009;9:88.
254. Fritsch P, Kleber M, Rosenkranz A, Fritsch M, Muntean W, Mangge H, et al. Haemostatic alterations in overweight children: Associations between metabolic syndrome, thrombin generation, and fibrinogen levels. *Atherosclerosis.* oct 2010;212(2):650-5.
255. Campello E, Zabeo E, Radu CM, Spiezia L, Gavasso S, Fadin M, et al. Hypercoagulability in overweight and obese subjects who are asymptomatic for thrombotic events. *Thromb Haemost.* janv 2015;113(1):85-96.
256. Sonnevli K, Tchaikovski SN, Holmström M, Antovic JP, Bremme K, Rosing J, et al. Obesity and thrombin-generation profiles in women with venous thromboembolism. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* juill 2013;24(5):547-53.
257. Ay L, Kopp H-P, Brix J-M, Ay C, Quehenberger P, Schernthaner G-H, et al. Thrombin generation in morbid obesity: significant reduction after weight loss. *J Thromb Haemost JTH.* avr 2010;8(4):759-65.
258. Stolberg CR, Mundbjerg LH, Funch-Jensen P, Gram B, Juhl CB, Bladbjerg E-M. Effects of gastric bypass followed by a randomized study of physical training on markers of coagulation activation, fibrin clot properties, and fibrinolysis. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatry Surg.* 26 mars 2018;
259. van Paridon PCS, Panova-Noeva M, van Oerle R, Schultz A, Hermanns IM, Prochaska JH, et al. Thrombin generation in cardiovascular disease and mortality - results from the Gutenberg Health Study. *Haematologica.* 5 déc 2019;
260. ten Cate-Hoek AJ, Dielis AWJH, Spronk HMH, van Oerle R, Hamulyák K, Prins MH, et al. Thrombin generation in patients after acute deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost.* août 2008;100(2):240-5.
261. Lutsey PL, Folsom AR, Heckbert SR, Cushman M. Peak thrombin generation and subsequent venous thromboembolism: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE) study. *J Thromb Haemost.* oct 2009;7(10):1639-48.

262. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA*. 26 juill 2006;296(4):397-402.
263. van Hylckama Vlieg A, Christiansen SC, Luddington R, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Baglin TP. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *Br J Haematol*. sept 2007;138(6):769-74.
264. van Hylckama Vlieg A, Baglin CA, Luddington R, MacDonald S, Rosendaal FR, Baglin TP. The risk of a first and a recurrent venous thrombosis associated with an elevated D-dimer level and an elevated thrombin potential: results of the THE-VTE study. *J Thromb Haemost JTH*. sept 2015;13(9):1642-52.
265. Besser M, Baglin C, Luddington R, van Hylckama Vlieg A, Baglin T. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *J Thromb Haemost JTH*. oct 2008;6(10):1720-5.
266. Sonnevli K, Tchaikovski SN, Holmström M, Rosing J, Bremme K, Lärfars G. Thrombin generation and activated protein C resistance in the absence of factor V Leiden correlates with the risk of recurrent venous thromboembolism in women aged 18-65 years. *Thromb Haemost*. nov 2011;106(5):901-7.
267. Eichinger S, Hron G, Kollars M, Kyrle PA. Prediction of recurrent venous thromboembolism by endogenous thrombin potential and D-dimer. *Clin Chem*. déc 2008;54(12):2042-8.
268. Chaireti R, Jennersjö C, Lindahl TL. Is thrombin generation at the time of an acute thromboembolic episode a predictor of recurrence? The Linköping Study on Thrombosis (LIST)--a 7-year follow-up. *Thromb Res*. févr 2013;131(2):135-9.
269. Kim HK, Kim JE, Park SH, Kim YI, Nam-Goong IS, Kim ES. High coagulation factor levels and low protein C levels contribute to enhanced thrombin generation in patients with diabetes who do not have macrovascular complications. *J Diabetes Complications*. mai 2014;28(3):365-9.
270. Quist-Paulsen P, Naess IA, Cannegieter SC, Romundstad PR, Christiansen SC, Rosendaal FR, et al. Arterial cardiovascular risk factors and venous thrombosis: results from a population-based, prospective study (the HUNT 2). *Haematologica*. janv 2010;95(1):119-25.
271. Orbe J, Zudaire M, Serrano R, Coma-Canella I, Martínez de Sizarro S, Rodríguez JA, et al. Increased thrombin generation after acute versus chronic coronary disease as assessed by the thrombin generation test. *Thromb Haemost*. févr 2008;99(2):382-7.
272. Loeffen R, van Oerle R, Leers MPG, Kragten JA, Crijns H, Spronk HMH, et al. Factor XIa and Thrombin Generation Are Elevated in Patients with Acute Coronary Syndrome and Predict Recurrent Cardiovascular Events. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158355.
273. Skeppholm M, Kallner A, Malmqvist K, Blombäck M, Wallén H. Is fibrin formation and thrombin generation increased during and after an acute coronary syndrome? *Thromb Res*. nov 2011;128(5):483-9.
274. Smid M, Dielis AWJH, Winkens M, Spronk HMH, Van Oerle R, Hamulyák K, et al. Thrombin generation in patients with a first acute myocardial infarction: Thrombin generation in patients. *J Thromb Haemost*. mars 2011;9(3):450-6.
275. Smid M, Dielis AWJH, Spronk HMH, Rumley A, van Oerle R, Woodward M, et al. Thrombin Generation in the Glasgow Myocardial Infarction Study. Kiechl S, éditeur. *PLoS ONE*. 24 juin 2013;8(6):e66977.
276. Schneider JG, Isermann B, Kleber ME, Wang H, Boehm BO, Grammer TB, et al. Inverse association of the endogenous thrombin potential (ETP) with cardiovascular death: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Int J Cardiol*. sept 2014;176(1):139-44.

277. Gremmel T, Koppensteiner R, Ay C, Panzer S. Residual thrombin generation potential is inversely linked to the occurrence of atherothrombotic events in patients with peripheral arterial disease. *Eur J Clin Invest.* 2014;44(3):319-24.
278. Hansen CH, Ritschel V, Andersen GØ, Halvorsen S, Eritsland J, Arnesen H, et al. Markers of Thrombin Generation Are Associated With Long-Term Clinical Outcome in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb.* 1 janv 2018;1076029618764847.
279. Rooth E, Sobocinski-Doliwa P, Antovic J, Frykman Kull V, Von Arbin M, Rosenqvist M, et al. Thrombin generation in acute cardioembolic and non-cardioembolic ischemic stroke. *Scand J Clin Lab Invest.* oct 2013;73(7):576-84.
280. Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, Spaft C, Ducimetière P, Ritchie K, et al. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juin 2011;31(6):1445-51.
281. Crombag GAJC, Spronk HM, Nelemans P, Schreuder FHBM, Truijman MTB, van Dijk AC, et al. No Association between Thrombin Generation and Intra-Plaque Haemorrhage in Symptomatic Carotid Atherosclerotic Plaques: The Plaque at RISK (PARISK) Study. *Thromb Haemost.* août 2018;118(8):1461-9.
282. Billoir P, Miranda S, Damian L, Richard V, Benhamou Y, Duchez VLC. Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: Evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* sept 2018;169:87-92.
283. Miranda S, Billoir P, Damian L, Thiebaut PA, Schapman D, Le Besnerais M, et al. Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. *PloS One.* 2019;14(3):e0212614.
284. Liestøl S, Sandset PM, Mowinckel M-C, Wisløff F. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost JTH.* nov 2007;5(11):2204-10.
285. Zuily S, Regnault V, Guillemin F, Kaminsky P, Rat A-C, Lecompte T, et al. Superficial vein thrombosis, thrombin generation and activated protein C resistance as predictors of thromboembolic events in lupus and antiphospholipid patients. A prospective cohort study. *Thromb Res.* juill 2013;132(1):e1-7.
286. Zuily S, de Laat B, Guillemin F, Kelchtermans H, Magy-Bertrand N, Desmurs-Clavel H, et al. Anti-Domain I β 2-Glycoprotein I Antibodies and Activated Protein C Resistance Predict Thrombosis in Antiphospholipid Syndrome: TAC(I)T Study. *J Appl Lab Med.* 23 juin 2020;
287. Liang Y, Leng R-X, Pan H-F, Ye D-Q. The prevalence and risk factors for serositis in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Rheumatol Int.* févr 2017;37(2):305-11.
288. Liang Y, Xie S-B, Wu C-H, Hu Y, Zhang Q, Li S, et al. Coagulation cascade and complement system in systemic lupus erythematosus. *Oncotarget.* 13 mars 2018;9(19):14862-81.
289. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost.* janv 2006;95(1):94-9.
290. Meesters EW, Hansen H, Spronk HMH, Hamulyak K, Rosing J, Rowshani AT, et al. The inflammation and coagulation cross-talk in patients with systemic lupus erythematosus. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* janv 2007;18(1):21-8.
291. Kern A, Barabás E, Balog A, Burcsár S, Kizselák M, Vásárhelyi B. Characterization of the thrombin generation profile in systemic lupus erythematosus. *Physiol Int.* 1 mars 2017;104(1):35-41.

292. Cicarini WB, Duarte RCF, Ferreira KS, Loures C de MG, Consoli RV, Neiva CLS, et al. Impact of markers of endothelial injury and hypercoagulability on systemic lupus erythematosus. *Lupus*. févr 2020;29(2):182-90.
293. Hansildaar R, Vedder D, Baniaamam M, Tausche A-K, Gerritsen M, Nurmohamed MT. Cardiovascular risk in inflammatory arthritis: rheumatoid arthritis and gout. *Lancet Rheumatol*. 1 sept 2020;
294. Gualtierotti R, Ingegnoli F, Griffini S, Grovetti E, Meroni PL, Cugno M. Prothrombotic biomarkers in patients with rheumatoid arthritis: the beneficial effect of IL-6 receptor blockade. *Clin Exp Rheumatol*. juin 2016;34(3):451-8.
295. Vranic A, Pruner I, Veselinovic M, Soutari N, Petkovic A, Jakovljevic V, et al. Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. nov 2019;38(11):3005-14.
296. Kern A, Balog A, Dulic S, Barabás E, Kizselák M, Vásárhelyi B. Alterations of the thrombin generation profile in rheumatoid arthritis. *J Thromb Thrombolysis*. avr 2016;41(3):359-64.
297. Undas A, Gissel M, Kwasny-Krochin B, Gluszko P, Mann KG, Brummel-Ziedins KE. Thrombin generation in rheumatoid arthritis: dependence on plasma factor composition. *Thromb Haemost*. août 2010;104(2):224-30.
298. Butta NV, Fernández-Bello I, López-Longo FJ, Jiménez-Yuste V. Endothelial Dysfunction and Altered Coagulation As Mediators of Thromboembolism in Behçet Disease. *Semin Thromb Hemost*. sept 2015;41(6):621-8.
299. Fernández-Bello I, López-Longo FJ, Arias-Salgado EG, Jiménez-Yuste V, Butta NV. Behçet's disease: new insight into the relationship between procoagulant state, endothelial activation/damage and disease activity. *Orphanet J Rare Dis*. 27 mai 2013;8:81.
300. Le Joncour A, Martos R, Loyau S, Lelay N, Dossier A, Cazes A, et al. Critical role of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with Behçet's disease. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(9):1274-82.
301. Mejía J-C, Espinosa G, Tàssies D, Reverter J-C, Cervera R. Endogenous thrombin potential in Behçet's disease: relationship with thrombosis and anticoagulant therapy. *Clin Exp Rheumatol*. août 2014;32(4 Suppl 84):S67-71.
302. Hilhorst M, Winckers K, Wilde B, van Oerle R, ten Cate H, Tervaert JWC. Patients with antineutrophil cytoplasmic antibodies associated vasculitis in remission are hypercoagulable. *J Rheumatol*. déc 2013;40(12):2042-6.
303. Mastalerz L, Celińska-Löwenhoff M, Krawiec P, Batko B, Tlustochowicz W, Undas A. Unfavorably Altered Fibrin Clot Properties in Patients with Eosinophilic Granulomatosis with Polyangiitis (Churg-Strauss Syndrome): Association with Thrombin Generation and Eosinophilia. *PloS One*. 2015;10(11):e0142167.
304. Yoshizawa H, Nogami K, Matsumoto T, Tsujii N, Sakai T, Takase T, et al. Dynamic evaluation of hemostasis in the acute phase of Kawasaki disease using comprehensive coagulation functional assays. *Thromb Res*. 2019;174:76-83.
305. Ito S, Fujiwara S-I, Ikeda T, Toda Y, Mashima K, Umino K, et al. Evaluation of thrombotic events in patients with immune thrombocytopenia. *Ann Hematol*. janv 2020;99(1):49-55.
306. Carrette M, Feugray G, Chamouni P, Le Cam Duchez V, Fretigny M, Barbay V, et al. Prednisolone treatment induced temporary factor IX normalization in mild hemophilia B who required an epidural infiltration: A case report. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. août 2019;58(4):512-4.
307. Garabet L, Ghanima W, Monceyron Jonassen C, Skov V, Holst R, Mowinckel M-C, et al. Effect of thrombopoietin receptor agonists on markers of coagulation and P-selectin in patients with immune thrombocytopenia. *Platelets*. 2019;30(2):206-12.
308. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. févr 1998;79(2):276-81.

309. Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation*. 20 avr 1999;99(15):1997-2002.
310. Mineo C. Inhibition of nitric oxide and antiphospholipid antibody-mediated thrombosis. *Curr Rheumatol Rep*. mai 2013;15(5):324.
311. Rousseau A, Van Dreden P, Mbemba E, Elalamy I, Larsen A, Gerotziafas GT. Cancer cells BXPC3 and MCF7 differentially reverse the inhibition of thrombin generation by apixaban, fondaparinux and enoxaparin. *Thromb Res*. déc 2015;136(6):1273-9.
312. Sassi M, Chakroun T, Mbemba E, Van Dreden P, Elalamy I, Larsen AK, et al. The Antithrombotic Potential of Tinzaparin and Enoxaparin Upon Thrombin Generation Triggered In Vitro by Human Ovarian Cancer Cells IGROV1. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. mars 2017;23(2):155-63.
313. Gerotziafas GT, Galea V, Mbemba E, Sassi M, Roman M-P, Khaterchi A, et al. Effect of low molecular weight heparins and fondaparinux upon thrombin generation triggered by human pancreatic cancer cells BXPC3. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12(6):893-902.
314. Perrin J, Depasse F, Lecompte T, French-speaking CAT group and under the aegis of GEHT, French-speaking CAT group (all in France unless otherwise stated);, French-speaking CAT group all in France unless otherwise stated. Large external quality assessment survey on thrombin generation with CAT: further evidence for the usefulness of normalisation with an external reference plasma. *Thromb Res*. juill 2015;136(1):125-30.
315. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Lecompte T, Siegemund T, Baglin T, et al. Standardisation of thrombin generation test--which reference plasma for TGT? An international multicentre study. *Thromb Res*. avr 2010;125(4):353-6.
316. Simantov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, et al. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest*. nov 1995;96(5):2211-9.
317. Zhang W, Gao F, Lu D, Sun N, Yin X, Jin M, et al. Anti- β 2 glycoprotein I antibodies in complex with β 2 glycoprotein I induce platelet activation via two receptors: apolipoprotein E receptor 2' and glycoprotein I β α . *Front Med*. mars 2016;10(1):76-84.
318. Proulle V, Furie RA, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Platelets are required for enhanced activation of the endothelium and fibrinogen in a mouse thrombosis model of APS. *Blood*. 24 juill 2014;124(4):611-22.
319. Gris J-C, Bouvier S, Molinari N, Galanaud J-P, Cochery-Nouvellon E, Mercier E, et al. Comparative incidence of a first thrombotic event in purely obstetric antiphospholipid syndrome with pregnancy loss: the NOH-APS observational study. *Blood*. 15 mars 2012;119(11):2624-32.
320. de Jesús GR, Sciascia S, Andrade D, Nascimento IS, Rosa R, Barbhaiya M, et al. Factors Associated with First Thrombosis in Patients Presenting with Obstetric Antiphospholipid Syndrome in APS Alliance For Clinical Trials & International Networking (APS ACTION) Clinical Database And Repository: a retrospective study. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 17 sept 2018;
321. Belizna C. Hydroxychloroquine as an anti-thrombotic in antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev*. avr 2015;14(4):358-62.
322. Canaud G, Bienaimé F, Tabarin F, Bataillon G, Seilhean D, Noël L-H, et al. Inhibition of the mTORC pathway in the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 24 juill 2014;371(4):303-12.
323. Garcia D, Erkan D. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. *N Engl J Med*. 27 2018;379(13):1290.

324. Sciascia S, Radin M, Sanna G, Cecchi I, Roccatello D, Bertolaccini ML. Clinical utility of the global anti-phospholipid syndrome score for risk stratification: a pooled analysis. *Rheumatol Oxf Engl*. 01 2018;57(4):661-5.
325. Pengo V, Testa S, Martinelli I, Ghirarduzzi A, Legnani C, Gresele P, et al. Incidence of a first thromboembolic event in carriers of isolated lupus anticoagulant. *Thromb Res*. janv 2015;135(1):46-9.
326. Arnaud L, Mathian A, Ruffatti A, Erkan D, Tektonidou M, Cervera R, et al. Efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies: an international and collaborative meta-analysis. *Autoimmun Rev*. mars 2014;13(3):281-91.
327. Schreiber K, Breen K, Parmar K, Rand JH, Wu X-X, Hunt BJ. The effect of hydroxychloroquine on haemostasis, complement, inflammation and angiogenesis in patients with antiphospholipid antibodies. *Rheumatol Oxf Engl*. 01 2018;57(1):120-4.
328. Billoir P, Miranda S, Damian L, Richard V, Benhamou Y, Le Cam Duchez V. Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: Evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies. *Thromb Res*. 2018;169:87-92.
329. Kassis J, Neville C, Rauch J, Busque L, Chang ER, Joseph L, et al. Antiphospholipid antibodies and thrombosis: association with acquired activated protein C resistance in venous thrombosis and with hyperhomocysteinemia in arterial thrombosis. *Thromb Haemost*. déc 2004;92(6):1312-9.
330. Zuily S, Ait Aissa K, Membre A, Regnault V, Lecompte T, Wahl D. Thrombin generation in antiphospholipid syndrome. *Lupus*. juin 2012;21(7):758-60.
331. Zuily S, Regnault V, Guillemin F, Kaminsky P, Rat A-C, Lecompte T, et al. Superficial vein thrombosis, thrombin generation and activated protein C resistance as predictors of thromboembolic events in lupus and antiphospholipid patients. A prospective cohort study. *Thromb Res*. juill 2013;132(1):e1-7.
332. Abreu MM, Danowski A, Wahl DG, Amigo M-C, Tektonidou M, Pacheco MS, et al. The relevance of « non-criteria » clinical manifestations of antiphospholipid syndrome: 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Technical Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Clinical Features. *Autoimmun Rev*. mai 2015;14(5):401-14.
333. Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, Cervera R, Hualde L, Shoenfeld Y, de Ramón E, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis*. juin 2015;74(6):1011-8.
334. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA*. 26 juill 2006;296(4):397-402.
335. Chaireti R, Jennersjö C, Lindahl TL. Is thrombin generation at the time of an acute thromboembolic episode a predictor of recurrence? The Linköping Study on Thrombosis (LIST)--a 7-year follow-up. *Thromb Res*. févr 2013;131(2):135-9.
336. Lin C, Borensztajn K, Spek CA. Targeting coagulation factor receptors - protease-activated receptors in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Thromb Haemost JTH*. 2017;15(4):597-607.
337. Smadja DM, Melero-Martin JM, Eikenboom J, Bowman M, Sabatier F, Randi AM. Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *J Thromb Haemost JTH*. juill 2019;17(7):1190-4.

338. Yasui H, Gabazza EC, Taguchi O, Risteli J, Risteli L, Wada H, et al. Decreased protein C activation is associated with abnormal collagen turnover in the intraalveolar space of patients with interstitial lung disease. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. oct 2000;6(4):202-5.
339. Lin C, von der Thüsen J, van der Poll T, Borensztajn K, Spek CA. Increased Mortality during Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis due to Low Endogenous Activated Protein C Levels. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 nov 2015;192(10):1257-9.
340. Yasui H, Gabazza EC, Tamaki S, Kobayashi T, Hataji O, Yuda H, et al. Intratracheal administration of activated protein C inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med*. juin 2001;163(7):1660-8.
341. Kataoka K, Taniguchi H, Kondoh Y, Nishiyama O, Kimura T, Matsuda T, et al. Recombinant Human Thrombomodulin in Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest*. août 2015;148(2):436-43.
342. Alagha K, Bourdin A, Chanez P. Reply: Increased Mortality during Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis due to Low Endogenous Activated Protein C Levels. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 nov 2015;192(10):1259-60.
343. Alagha K, Secq V, Pahus L, Sofalvi T, Palot A, Bourdin A, et al. We should prohibit warfarin in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 avr 2015;191(8):958-60.
344. Hashmi MD, Alnababteh M, Vedantam K, Alunikummannil J, Oweis ES, Shorr AF. Assessing the need for transfer to the intensive care unit for Coronavirus-19 disease: Epidemiology and risk factors. *Respir Med*. déc 2020;174:106203.
345. Cheng F-Y, Joshi H, Tandon P, Freeman R, Reich DL, Mazumdar M, et al. Using Machine Learning to Predict ICU Transfer in Hospitalized COVID-19 Patients. *J Clin Med*. 1 juin 2020;9(6).
346. Allenbach Y, Saadoun D, Maalouf G, Vieira M, Hellio A, Boddaert J, et al. Development of a multivariate prediction model of intensive care unit transfer or death: A French prospective cohort study of hospitalized COVID-19 patients. *PloS One*. 2020;15(10):e0240711.
347. Hu L, Chen S, Fu Y, Gao Z, Long H, Ren H-W, et al. Risk Factors Associated With Clinical Outcomes in 323 Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Hospitalized Patients in Wuhan, China. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 19 2020;71(16):2089-98.
348. Li X, Xu S, Yu M, Wang K, Tao Y, Zhou Y, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol*. juill 2020;146(1):110-8.
349. Cummings MJ, Baldwin MR, Abrams D, Jacobson SD, Meyer BJ, Balough EM, et al. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet Lond Engl*. 06 2020;395(10239):1763-70.
350. Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood*. 28 2019;133(9):906-18.
351. Zhang L, Yan X, Fan Q, Liu H, Liu X, Liu Z, et al. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost JTH*. 2020;18(6):1324-9.
352. Naymagon L, Zubizarreta N, Feld J, van Gerwen M, Alsen M, Thibaud S, et al. Admission D-dimer levels, D-dimer trends, and outcomes in COVID-19. *Thromb Res*. 2020;196:99-105.
353. Luo X, Zhou W, Yan X, Guo T, Wang B, Xia H, et al. Prognostic Value of C-Reactive Protein in Patients With Coronavirus 2019. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 19 2020;71(16):2174-9.

354. Lippi G, Cervellin G, Franchini M, Favalaro EJ. Biochemical markers for the diagnosis of venous thromboembolism: the past, present and future. *J Thromb Thrombolysis*. nov 2010;30(4):459-71.
355. Chung H, Lee JH, Jo YH, Hwang JE, Kim J. Circulating Monocyte Counts and its Impact on Outcomes in Patients With Severe Sepsis Including Septic Shock. *Shock Augusta Ga*. 2019;51(4):423-9.
356. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 10 oct 2011;11(11):762-74.
357. Miyashita N, Matsushima T, Oka M, Japanese Respiratory Society null. The JRS guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults: an update and new recommendations. *Intern Med Tokyo Jpn*. 2006;45(7):419-28.
358. Ahn JH, Choi EY. Expanded A-DROP Score: A New Scoring System for the Prediction of Mortality in Hospitalized Patients with Community-acquired Pneumonia. *Sci Rep*. 01 2018;8(1):14588.
359. Rauch A, Labreuche J, Lassalle F, Goutay J, Caplan M, Charbonnier L, et al. Coagulation biomarkers are independent predictors of increased oxygen requirements in COVID-19. *J Thromb Haemost JTH*. 17 août 2020;
360. Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*. 04 2020;135(23):2033-40.
361. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, Chuich T, Dreyfus I, Driggin E, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 16 2020;75(23):2950-73.
362. Zhang L, Feng X, Zhang D, Jiang C, Mei H, Wang J, et al. Deep Vein Thrombosis in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China: Prevalence, Risk Factors, and Outcome. *Circulation*. 14 2020;142(2):114-28.
363. de Laat-Kremers RMW, Ninivaggi M, Devreese KMJ, de Laat B. Towards standardization of thrombin generation assays: Inventory of thrombin generation methods based on results of an International Society of Thrombosis and Haemostasis Scientific Standardization Committee survey. *J Thromb Haemost JTH*. août 2020;18(8):1893-9.
364. Ninivaggi M, de Laat-Kremers R, Tripodi A, Wahl D, Zuily S, Dargaud Y, et al. Recommendations for the measurement of thrombin generation: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost JTH*. mai 2021;19(5):1372-8.
365. Tanaka KA, Szlam F, Sun HY, Taketomi T, Levy JH. Thrombin generation assay and viscoelastic coagulation monitors demonstrate differences in the mode of thrombin inhibition between unfractionated heparin and bivalirudin. *Anesth Analg*. oct 2007;105(4):933-9, table of contents.
366. Hardy M, Michaux I, Lessire S, Douxfils J, Dogné J-M, Bareille M, et al. Prothrombotic disturbances of hemostasis of patients with severe COVID-19: A prospective longitudinal observational study. *Thromb Res*. janv 2021;197:20-3.
367. Nougier C, Benoit R, Simon M, Desmurs-Clavel H, Marcotte G, Argaud L, et al. Hypofibrinolytic state and high thrombin generation may play a major role in SARS-COV2 associated thrombosis. *J Thromb Haemost JTH*. sept 2020;18(9):2215-9.
368. Lee JJ, Ha ACT, Dorian P, Verma M, Goodman SG, Friedrich JO. Meta-Analysis of Safety and Efficacy of Direct Oral Anticoagulants Versus Warfarin According to Time in Therapeutic Range in Atrial Fibrillation. *Am J Cardiol*. 1 févr 2021;140:62-8.
369. Khan F, Tritschler T, Kahn SR, Rodger MA. Venous thromboembolism. *The Lancet*. 3 juill 2021;398(10294):64-77.

370. Evrard J, Hardy M, Dogné J-M, Lessire S, Maloteau V, Mullier F, et al. Are the DOAC plasma level thresholds appropriate for clinical decision-making? A reappraisal using thrombin generation testing. *Int J Lab Hematol.* févr 2021;43(1):e48-51.
371. Foulon-Pinto G, Jourdi G, Perrin J, Abdoul J, Paris G, Gouin-Thibault I, et al. Study of thrombin generation with St Genesisia to evaluate xaban pharmacodynamics: Analytical performances over 18 months. *Int J Lab Hematol.* août 2021;43(4):821-30.
372. Pfrepper C, Metze M, Siegemund A, Klöter T, Siegemund T, Petros S. Direct oral anticoagulant plasma levels and thrombin generation on ST Genesisia system. *Res Pract Thromb Haemost.* mai 2020;4(4):619-27.
373. Jourdi G, Siguret V, Martin AC, Golmard J-L, Godier A, Samama C-M, et al. Association rate constants rationalise the pharmacodynamics of apixaban and rivaroxaban. *Thromb Haemost.* juill 2015;114(1):78-86.
374. Metze M, Klöter T, Stöbe S, Rechenberger B, Siegemund R, Siegemund T, et al. Plasma levels do not predict thrombin generation in patients taking direct oral anticoagulants. *Int J Lab Hematol.* 7 juin 2021;
375. Monteyne T, De Kesel P, Devreese KMJ. Interference of DOAC stop and DOAC remove in the thrombin generation assay and coagulation assays. *Thromb Res.* août 2020;192:96-9.
376. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* 2016;62(5):699-707.
377. Douxfils J, Morimont L, Delvigne A-S, Devel P, Masereel B, Haguet H, et al. Validation and standardization of the ETP-based activated protein C resistance test for the clinical investigation of steroid contraceptives in women: an unmet clinical and regulatory need. *Clin Chem Lab Med.* 28 janv 2020;58(2):294-305.
378. Chabloz P, Reber G, Boehlen F, Hohlfeld P, de Moerloose P. TAFI antigen and D-dimer levels during normal pregnancy and at delivery. *Br J Haematol.* oct 2001;115(1):150-2.
379. Righini M, Perrier A, De Moerloose P, Bounameaux H. D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. *J Thromb Haemost JTH.* juill 2008;6(7):1059-71.
380. Lippi G, Franchini M, Biasiutti C, Dellagiacomma G, Salvagno GL, Guidi GC. Increased D-dimer value and occult cancer in the absence of detectable thrombosis. *Haematologica.* avr 2007;92(4):e53-55.
381. Rodger MA, Le Gal G, Langlois NJ, Gin B, Mallick R, Giulivi A, et al. « HERDOO2 » clinical decision rule to guide duration of anticoagulation in women with unprovoked venous thromboembolism. Can I use any d-Dimer? *Thromb Res.* 2018;169:82-6.
382. Steinbrecher O, Šinkovec H, Eischer L, Kyrle PA, Eichinger S. D-dimer levels over time after anticoagulation and the association with recurrent venous thromboembolism. *Thromb Res.* janv 2021;197:160-4.
383. Marcucci M, Iorio A, Douketis JD, Eichinger S, Tosetto A, Baglin T, et al. Risk of recurrence after a first unprovoked venous thromboembolism: external validation of the Vienna Prediction Model with pooled individual patient data. *J Thromb Haemost JTH.* mai 2015;13(5):775-81.
384. van Es N, Louzada M, Carrier M, Tagalakis V, Gross PL, Shivakumar S, et al. Predicting the risk of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer: A prospective cohort study. *Thromb Res.* mars 2018;163:41-6.
385. Schorling RM, Pfrepper C, Golombek T, Cella CA, Muñoz-Unceta N, Siegemund R, et al. Evaluation of Biomarkers for the Prediction of Venous Thromboembolism in Ambulatory Cancer Patients. *Oncol Res Treat.* 2020;43(9):414-27.

386. Gerotziafas GT, Zografos T, Pantos I, Lefkou E, Carlo A, Fareed J, et al. Prospective Assessment of Biomarkers of Hypercoagulability for the Identification of Patients With Severe Coronary Artery Disease. The ROADMAP-CAD Study. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. déc 2020;26:1076029620964590.
387. Wang H, Rosendaal FR, Cushman M, van Hylckama Vlieg A. D-dimer, thrombin generation, and risk of a first venous thrombosis in the elderly. *Res Pract Thromb Haemost*. juill 2021;5(5):e12536.
388. Dargaud Y, Hierso S, Rugeri L, Battie C, Gaucherand P, Négrier C, et al. Endogenous thrombin potential, prothrombin fragment 1+2 and D-dimers during pregnancy. *Thromb Haemost*. févr 2010;103(2):469-71.
389. Poli D, Antonucci E, Cecchi E, Betti I, Lapini I, Gazzini A, et al. Clotting activation after oral anticoagulant therapy discontinuation: a risk factor for recurrent venous thromboembolism. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*. avr 2004;15(3):221-5.
390. Wexels F, Dahl OE, Pripp AH, Seljeflot I. Thrombin Generation in Patients With Suspected Venous Thromboembolism. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. juill 2017;23(5):416-21.
391. Smid M, Dielis AWJH, Winkens M, Spronk HMH, van Oerle R, Hamulyák K, et al. Thrombin generation in patients with a first acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost JTH*. mars 2011;9(3):450-6.
392. Joly B, Barbay V, Borg J-Y, Le Cam-Duchez V. Comparison of markers of coagulation activation and thrombin generation test in uncomplicated pregnancies. *Thromb Res*. sept 2013;132(3):386-91.
393. Joly BS, Sudrié-Arnaud B, Barbay V, Borg J-Y, Le Cam Duchez V. Thrombin generation test as a marker for high risk venous thrombosis pregnancies. *J Thromb Thrombolysis*. janv 2018;45(1):114-21.