



**HAL**  
open science

# Mécanismes inflammatoires induits par les cellules endothéliales dans la maladie veineuse thromboembolique : inflammation et thrombose veineuse

Maria Najem

► **To cite this version:**

Maria Najem. Mécanismes inflammatoires induits par les cellules endothéliales dans la maladie veineuse thromboembolique : inflammation et thrombose veineuse. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2022. Français. NNT : 2022BRES0086 . tel-04086986

**HAL Id: tel-04086986**

**<https://theses.hal.science/tel-04086986v1>**

Submitted on 2 May 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : *Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale*

Par **Maria NAJEM**

## **Mécanismes inflammatoires induits par les cellules endothéliales dans la maladie veineuse thromboembolique**

Inflammation et thrombose veineuse

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 1<sup>er</sup> décembre 2022

Unité de recherche : **UMR1304 - GETBO**

### **Rapporteurs :**

Dr. Aurélie LEROYER

MCF, HDR, Université d'Aix-Marseille

Dr. Christophe GUIGNABERT

DR2 INSERM, HDR, Université Paris-Saclay

### **Composition du Jury :**

Président

Prof. Pierre-Emmanuel MORANGE

PU-PH, HDR, Université d'Aix-Marseille

Rapporteurs

Dr. Aurélie LEROYER

MCF, HDR, Université d'Aix-Marseille

Dr. Christophe GUIGNABERT

DR2 INSERM, HDR, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Prof. Delphine BORGEL

PU-PH, HDR, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

Prof. Francis COUTURAUD

PU-PH, HDR, Université de Bretagne Occidentale

Co-directrice de thèse

Dr. Catherine LEMARIE

CRCN INSERM, HDR, Université de Bretagne Occidentale

## Remerciements

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries. » - Marcel Proust

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Monsieur Francis Couturaud, pour la confiance qu'il m'a accordée, son support continu et sa bienveillance.

Je souhaite remercier ma co-directrice de thèse, Madame Catherine Lemarié, pour sa rigueur, son encadrement, ses conseils et sa disponibilité constante.

Je remercie sincèrement Monsieur Pierre-Emmanuel Morange, Madame Aurélie Leroyer, Monsieur Christophe Guignabert et Madame Delphine Borgel qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse au regard de leurs expertises respectives.

J'exprime ma gratitude envers Virginie, Lénaïck et Lauriane, pour leur enthousiasme et leur aide technique précieuse.

J'adresse mes remerciements aux doctorants de l'équipe UMR 1304, Marion, Estelle et Marc, avec qui j'ai partagé ces années de thèse.

Au terme de ce parcours, je dédie ce travail à celles et ceux qui me sont chers, ma famille, Élie et mes amis. Quelques mots ne suffisent pas, mais je vous remercie pour votre soutien inconditionnel.

# Table des matières

Table des matières.....	3
Liste des figures .....	6
Liste des tableaux.....	8
Liste des abréviations.....	9
INTRODUCTION .....	17
I. Généralités sur la maladie veineuse thromboembolique .....	18
I.1. Définition, épidémiologie et facteurs de risque .....	18
I.2. Complications .....	19
I.3. Traitements .....	20
I.4. Modèles expérimentaux.....	22
II. Hémostase physiologique.....	26
II.1. Mécanismes de l'hémostase .....	26
II.1.1. Rôle des plaquettes .....	26
II.1.2. Rôle des systèmes de coagulation et de fibrinolyse .....	29
II.1.3. Régulation des mécanismes de l'hémostase .....	30
III. Endothélium.....	33
III.1. Structure de la paroi veineuse .....	33
III.2. Fonctions physiologiques de l'endothélium .....	33
III.2.1. Endothélium et perméabilité vasculaire .....	33
III.2.2. Endothélium et tonus vasculaire .....	35
III.2.3. Endothélium et hémostase.....	36
III.2.4. Endothélium et inflammation.....	37
III.3. Dysfonction endothéliale et MVTE .....	37
IV. Thromboinflammation.....	40
a) Thromboinflammation dans la thrombose artérielle .....	40
b) Thromboinflammation dans la thrombose veineuse profonde.....	42
IV.1. Système immunitaire inné dans la MVTE.....	45
IV.1.1. Neutrophiles .....	45
IV.1.1.1. Généralités sur les neutrophiles.....	45
IV.1.1.2. Neutrophiles dans la MVTE.....	50
IV.1.2. Monocytes et macrophages .....	53
IV.1.2.1. Généralités sur les monocytes et les macrophages.....	53

IV.1.2.2. Monocytes et macrophages dans la MVTE.....	56
IV.1.3. Mastocytes .....	59
IV.1.3.1. Généralités sur les mastocytes.....	59
IV.1.3.2. Mastocytes dans la MVTE .....	60
IV.1.4. Cellules NK.....	62
IV.1.4.1. Généralités sur les cellules NK .....	62
IV.1.4.2. Cellules NK dans la MVTE .....	63
IV.1.5. Système du complément.....	65
IV.1.5.1. Généralités sur le système du complément .....	65
IV.1.5.2. Système du complément dans la MVTE .....	68
IV.2. Système immunitaire adaptatif dans la MVTE.....	71
IV.2.1. Lymphocytes T .....	71
IV.2.1.1. Généralités sur les lymphocytes T .....	71
IV.2.1.2. Lymphocytes T dans la MVTE .....	72
IV.2.2. Lymphocytes B .....	75
IV.2.2.1. Généralités sur les lymphocytes B .....	75
IV.2.2.2. Lymphocytes B dans la MVTE.....	76
V. DAMPs et TLRs dans la MVTE.....	77
V.1. DAMPs dans la MVTE .....	77
V.1.1. Adénosine triphosphate. ....	77
V.1.2. Protéine HMGB1 .....	78
V.1.3. ARN extracellulaires .....	80
V.2. TLRs dans la MVTE .....	82
V.2.1. Historique et classification des TLRs.....	82
V.2.2. Voies de signalisation des TLRs .....	84
V.2.3. TLR9 dans la MVTE.....	87
RÉSULTATS.....	89
VI. Présentation des travaux de recherche .....	90
VI.1. Article 1 .....	90
VI.1.1. Présentation de l'article 1 .....	90
VI.1.2. Résultats de l'article 1 .....	91
ARTICLE.....	95
VI.2. Article 2 en cours de préparation .....	119
VI.2.1. Présentation de l'article 2.....	119
VI.2.2. Matériels et méthodes de l'article 2 .....	122

VI.2.2.2.1. Modèle murin de stase veineuse.....	122
VI.2.2.2.2. Cytométrie en flux.....	122
VI.2.3. Résultats préliminaires de l'article 2.....	130
DISCUSSION .....	145
VII. Discussion générale.....	146
Références bibliographiques.....	156
ANNEXE .....	180

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Algorithme de sélection du modèle de thrombose veineuse profonde.....	23
<b>Figure 2</b> : Voies de signalisation plaquettaire.....	28
<b>Figure 3</b> : Phases de l'hémostase physiologique .....	30
<b>Figure 4</b> : Modulation des voies de coagulation par les protéines anticoagulantes .....	32
<b>Figure 5</b> : Contrôle de la perméabilité vasculaire .....	34
<b>Figure 6</b> : Contrôle du tonus vasculaire .....	36
<b>Figure 7</b> : Contribution de l'endothélium à l'hémostase et à la TVP .....	39
<b>Figure 8</b> : Coopération entre les plaquettes, les neutrophiles et les éosinophiles dans la thrombose artérielle .....	42
<b>Figure 9</b> : Interaction entre les plaquettes, les neutrophiles et les monocytes dans la thrombose veineuse profonde .....	44
<b>Figure 10</b> : Développement et fonctions des neutrophiles.....	46
<b>Figure 11</b> : Mécanismes moléculaires régulant la NETose .....	49
<b>Figure 12</b> : Fonctions des NETs dans la thrombose veineuse profonde.....	52
<b>Figure 13</b> : Dynamique des monocytes et des macrophages .....	55
<b>Figure 14</b> : Rôle des monocytes et des macrophages dans la thrombose veineuse profonde.....	58
<b>Figure 15</b> : Voies du système du complément.....	66
<b>Figure 16</b> : Interdépendance des systèmes du complément, de la coagulation et de la fibrinolyse .....	68
<b>Figure 17</b> : Voies de signalisation des TLRs .....	86
<b>Figure 18</b> : Interconnexion des voies de signalisation des DAMPs dans la thrombose veineuse profonde .....	88
<b>Figure 19</b> : Génération des cellules B mémoires et des plasmocytes .....	121
<b>Figure 20</b> : Stratégie d'analyse des cellules B au niveau de la rate (Panel 1) .....	125
<b>Figure 21</b> : Stratégie d'analyse des cellules B au niveau de la rate (Panel 2) .....	126
<b>Figure 22</b> : Stratégie d'analyse des cellules T, NK et des leucocytes sécrétant l'IFN- $\gamma$ au niveau de la rate (Panel 3) et du sang (Panel 4).....	127
<b>Figure 23</b> : Stratégie d'analyse des cellules B, des neutrophiles et des monocytes au niveau du sang (Panel 5).....	128
<b>Figure 24</b> : Stratégie d'analyse des cellules B au niveau de la moelle osseuse (Panel 6) ....	129
<b>Figure 25</b> : Taux de cellules B, NK, T, T CD8 <sup>+</sup> et TCD4 <sup>+</sup> au niveau de la paroi veineuse de souris sham ou ayant subi la thrombose veineuse .....	133
<b>Figure 26</b> : Caractérisation des cellules B au niveau de la rate d'une souris à J7 (Panel 1). 134	
<b>Figure 27</b> : Caractérisation des cellules B au niveau de la rate d'une souris à J7 (Panel 2). 135	
<b>Figure 28</b> : Caractérisation des cellules T, NK et CD45 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> au niveau de la rate d'une souris à J7 (Panel 3).....	136
<b>Figure 29</b> : Caractérisation des cellules T, NK et CD45 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> au niveau du sang d'une souris à J7 (Panel 4).....	137
<b>Figure 30</b> : Caractérisation des cellules B et des granulocytes au niveau du sang d'une souris à J7 (Panel 5).....	138

<b>Figure 31</b> : Caractérisation des cellules B au niveau de la moelle osseuse d'une souris à J7 (Panel 6).....	139
<b>Figure 32</b> : Taux de cellules B, B2, T2 et MZB au niveau de la rate à J2 et J7 .....	140
<b>Figure 33</b> : Taux de cellules B, Breg, B mémoires CD73 <sup>+</sup> et de plasmocytes au niveau de la rate à J2 et J7 .....	141
<b>Figure 34</b> : Taux de cellules T, T4, T8, T <sub>EM</sub> , T <sub>CM</sub> , T <sub>N</sub> , Treg, NK et CD45 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> au niveau de la rate à J2 et J7 .....	142
<b>Figure 35</b> : Taux de cellules T, T4, T8, T <sub>EM</sub> , T <sub>CM</sub> , T <sub>N</sub> , Treg, NK et CD45 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> au niveau du sang à J2 et J7 .....	143
<b>Figure 36</b> : Taux de cellules B, B2, B mémoires CD73 <sup>+</sup> et de monocytes au niveau du sang à J2 et J7.....	144
<b>Figure 37</b> : Taux de cellules B, B2 et B mémoires CD73 <sup>+</sup> au niveau de la moelle osseuse à J2 et J7 .....	144



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Stratification des facteurs de risque de la MVTE en fonction du risque de récurrence à long terme.....	19
<b>Tableau 2</b> : Avantages et inconvénients des ACOD par rapport aux AVK .....	22
<b>Tableau 3</b> : Comparaison des techniques chirurgicales des différents modèles de thrombose veineuse profonde .....	24
<b>Tableau 4</b> : Comparaison des avantages et des inconvénients des différents modèles de thrombose veineuse profonde .....	25
<b>Tableau 5</b> : Implication des TLRs reconnaissant des DAMPs dans les maladies inflammatoires .....	83
<b>Tableau 6</b> : Liste des anticorps utilisés .....	123
<b>Tableau 7</b> : Phénotypes des cellules immunitaires .....	124
<b>Tableau 8</b> : Liste des produits utilisés .....	124

## Liste des abréviations

**A $\beta$**  : Amyloid  $\beta$

**AC** : Adénylate cyclase

**ACOD** : Anticoagulants oraux directs

**ADAMTS13** : A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13

**Adora1** : Adenosine A1 receptor

**ADP** : Adénosine diphosphate

**AIM2** : Absent in melanoma 2

**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique

**Ang-1** : Angiopoïétine-1

**ANO6** : Anoctamin 6

**AP-1** : Activator protein 1

**ASC** : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

**AT** : Antitrombin

**ATG7** : Autophagy-related protein

**ATP** : Adenosine Triphosphate

**AVK** : Antagonistes de la vitamine K

**AZU** : Azurophilic granule

**BCR** : B-cell receptor

**Bmal1** : Brain and muscle Arnt-like protein-1

**CalDAG-GEFI** : Ca<sup>2+</sup> - and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide-exchange factor I

**CAM** : Complexe d'attaque membranaire

**C3aR** : C3a receptor

**Cbl-b** : *Casitas B-lineage lymphoma b*

**C4BP** : C4b-binding protein

**CCL2** : C-C motif chemokine ligand 2

**CCR7** : CC-chemokine receptor 7

**CDF** : Cellule dendritique folliculaire

**CG** : Cathepsin G

**CG** : Centre germinatif

**Cl<sup>-</sup>** : Anions chlorures

**CLEC2** : C-type lectin-like receptor 2

**CLP** : Common lymphoid progenitors

**CMH II** : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

**CMLs** : Cellules musculaires lisses

**CMoP** : Common monocyte progenitor

**COX1** : Cyclooxygénase 1

**CPG** :Cytosine-phosphate Guanine

**cPLA<sub>2</sub>** : Ca<sup>2+</sup>-dependent and protein kinase-dependent activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>

**CR1** : Complement receptor 1

**CREB** : cAMP-responsive element-binding protein

**CRP** : C- reactive protein

**CSF1** : Colony-stimulating factor 1

**CXCL12** : C-X-C motif chemokine ligand 12

**CXCR4** : C-X-C Motif Chemokine Receptor 4

**CX3CR1** : CX3C chemokine receptor 1

**CYP450** : Cytochrome P450

**DAF** : Decay-accelerating factor

**DDL4** : Delta-like 4

**DEAF** : Deformed Epidermal Autoregulatory Factor 1

**DH** : Double high

**dsDNA** : Double-stranded DNA

**ds-HMGB1** : disulfide HMGB1

**dsRNA** : Double-stranded RNA

**DTA** : Diphteria toxin A

**DUBA** : Deubiquitinating enzyme A

**ECE-1** : Endothelin-converting enzyme-1

**EETs** : Eosinophil extracellular traps

**ENTs** : Equilibrative nucleoside transporter

**ENTPD1** : Ectonucleoside tri(di)phosphohydrolase-1

**EP** : Embolie pulmonaire

**EPCR** : Endothelial Protein C Receptor

**ERK** : Extracellular signal-regulated kinase

**ET-1** : Endothéline-1

**FADD** : FAS-associated death domain

**FARIVE** : FActeurs de RIisque et de récidives de la maladie thromboembolique VEineuse

**FeCl3** : Chlorure de Fer

**FO** : Follicular B cell

**FOXP3** : Forkhead box protein P3

**fr-HMGB1** : fully reduced HMGB1

**FSAP** : Factor VII-activating protease

**FT** : Facteur tissulaire

**GAIT** : Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia

**Gas6** : Growth arrest–specific 6

**GC** : Guanylate cyclase

**G-CSF** : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

**GM-CSF** : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

**GMP** : Granulocyte–macrophage progenitor

**GSDMD** : Gasdermine D

**HIF-1 $\alpha$**  : Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$

**HMGB1** : High mobility group protein B

**HMGN1** : High-mobility group nucleosome binding domain 1

**HNA-3b** : Human neutrophil antigen 3b

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**HOCl** : Acide hypochloreux

**HRG** : Histidine-rich glycoprotein

**HSC** : Haematopoietic stem cell

**HSPs** : Heat shock proteins

**HSV-1** : Herpes simplex virus 1

**HTP-TEC** : Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique

**HUVECs** : Human umbilical vein endothelial cells

**ICAM-1** : Intercellular Adhesion Molecule 1

**iC3Bb** : Initiation phase C3 convertase

**IκBα** : Inhibitor of NF-κBα

**IKK** : IκB Kinase

**IL-1R** : Interleukin-1 receptor

**IL-15Rα** : IL-15 receptor alpha

**ILC** : Innate lymphoid cells

**INR** : International normalized ratio

**IRA** : Innate response activator

**IRAK** : IL-1 receptor-associated kinase

**IRF** : IFN-regulatory factor

**ISRE** : IFN-stimulated response element

**JAHA** : Journal of the American Heart Association

**JNK** : JUN N-terminal kinase

**K1** : Kunitz domain 1

**KLF2** : Krüppel-like factor 2

**LBP** : LPS-binding protein

**LETS** : Leiden Thrombophilia Study

**LPS** : Lipopolysaccharide

**LRR** : Leucine-rich repeat

**Ly6C** : Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1

**Mac1** : Macrophage-1 antigen

**MAL** : MYD88 adaptor-like protein

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase

**MAP3K** : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8

**MARTHA** : MARseille THrombosis Association study

**MASPs** : MBL-associated serine proteases

**MBL** : Mannose Binding Lectin

**MBP** : Major basic protein

**MCP** : Membrane co-factor protein

**MD2** : Myeloid differentiation factor 2

**MDM** : Macrophages dérivés des monocytes

**MDP** : Macrophage and dendritic cell precursor

**MEK** : Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase

**MFI** : Mean Fluorescence Intensity

**MKK** : Mitogen-activated protein kinase kinase

**Mmp2** : Matrix metalloproteinase 2

**MPO** : Myéloperoxydase

**mTOR** : Mechanistic target of rapamycin

**MVTE** : Maladie veineuse thromboembolique

**MyD88** : Myeloid differentiation primary-response protein 88

**MZ** : Marginal zone B cell

**NADPH** : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

**Ncr1** : Natural cytotoxicity triggering receptor 1

**NE** : Neutrophil elastase

**NEMO** : NF- $\kappa$ B essential modulator

**NETs** : Neutrophil Extracellular Traps

**NFAT** : Nuclear factor of activated T cells

**NF- $\kappa$ B** : Nuclear factor-kappa B

**NLRC4** : NLR family CARD domain containing 4

**NLRP3** : NLR family pyrin domain containing 3

**NLS** : Nuclear localization signal

**NO** : Monoxyde d'azote

**NOHA** : N-hydroxyarginine

**NOS** : NO synthases

**NR4A1** : Nuclear receptor group 4 family A member 1, Nur77

**O<sup>2-</sup>** : Anion superoxide

**ox-HMGB1** : oxidized HMGB1

**oxLDL** : Oxidized Low-density Lipoprotein

**PAD4** : Peptidyl arginine deiminase 4

**PAI-1** : Plasminogen activator inhibitor-1

**PAMPs** : Pathogen Associated Molecular Patterns

**PAR** : Protease-Activated Receptor1

**PC** : Protéine C

**PCI** : Protein C inhibitor

**PDI** : Protéine disulfide isomérase

**PGI<sub>2</sub>** : Prostaglandine I<sub>2</sub>

**PGM** : Progéniteurs granulocytes-macrophages

**PI3Ks** : Phosphoinositide 3-kinases

**PKCs** : Protein kinases C

**Plau** : Urokinase-type plasminogen activator

**PMA** : Phorbol myristate acétate

**Poly(I:C)** : Polyinosinic-polycytidylic acid

**PRRs** : Pattern Recognition Receptors

**PS** : Protéine S

**PSGL-1** : P-selectin glycoprotein ligand 1

**PTPRC** : Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C

**RAGE** : Receptor for advanced glycation end products

**RAP1B** : RAS-related protein

**RIP-1** : Receptor-interacting protein 1

**RIPC** : Remote Ischemic Preconditioning

**RIPK1** : Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1

**ROBO1** : Roundabout guidance receptor 1

**ROCK** : Rho-associated protein kinase

**ROR $\gamma$ t** : RAR-related orphan receptor gamma t

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**SAA** : Serum amyloid

**SARM** : Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein

**SARM1** : Sterile alpha and TIR motif containing 1  
**SCF** : Stem cell factor  
**SFKs** : SRC-family kinases  
**SGRs** : Small G-protein regulators  
**SH** : Single high  
**SNAPIN** : SNAP-associated protein  
**SNAREs** : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptor  
**SNPs** : Single nucleotide polymorphisms  
**SOCS1** : Suppressor of cytokine signaling protein 1  
**S1P5** : Sphingosine-1 phosphate 5 receptor  
**SPARC** : secreted protein acidic and rich in cysteine  
**SPT** : Syndrome post-thrombotique  
**ssRNA** : Single-stranded RNA  
**STKs** : Serine/threonine-protein kinases  
**T1** : Transitional B cell type 1  
**T2** : Transitional B cell type 2  
**TAB** : TAK1-binding protein  
**TAK1** : Transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1  
**TANK** : TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator  
**TAT** : Thrombin-antithrombin complex  
**TBK1** : TANK-binding kinase 1  
**T<sub>C</sub>** : Cytotoxic T cell  
**T<sub>CM</sub>** : Central memory T cell  
**TCR** : T cell receptor  
**T<sub>EM</sub>** : Effector memory T cell  
**T<sub>FH</sub>** : Follicular helper T cell  
**TFPI** : Tissue factor pathway inhibitor  
**T<sub>H</sub>** : T helper cell  
**TIR** : Toll-interleukin-1 receptor  
**TL** : Triple high



**TLR2** : Toll-like receptor 2

**TM** : Thrombomoduline

**TNF- $\alpha$**  : Tumour necrosis factor alpha

**TNF-Rp55** : Tumor necrosis factor receptor p55

**TP** : TXA2 receptor

**TRAF6** : Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6

**TRAM** : TRIF-related adaptor molecule

**T<sub>reg</sub>** : Regulatory T cell

**TRIF** : TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN $\beta$

**TRIM38** : Tripartite motif 38

**T<sub>RM</sub>** : Tissue resident memory T cell

**t-PA** : Tissue plasminogen activator

**TVP** : Thrombose veineuse profonde

**TXA2** : Thromboxane A2

**UNC93B1** : Unc-93 homolog B1

**UPA** : Urokinase-like plasminogen activator

**USP4** : Ubiquitin Specific Peptidase 4

**VCAM-1** : Vascular Cell Adhesion Protein 1

**VCI** : Veine cave inférieure

**VEGF** : Vascular endothelial growth factor

**vWF** : von Willebrand Factor

**ZPI** : Protein Z-dependent protease inhibitor

# **INTRODUCTION**

# **I. Généralités sur la maladie veineuse thromboembolique**

## **I.1. Définition, épidémiologie et facteurs de risque**

La maladie veineuse thromboembolique (MVTE) regroupe la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP). La TVP est caractérisée par l'obstruction totale ou partielle de la lumière d'une veine profonde par un caillot sanguin. Quant à l'EP, elle résulte de la migration du thrombus veineux périphérique dans l'arbre artériel pulmonaire (1).

L'incidence annuelle de la MVTE est comprise entre 104 et 183 cas pour 100 000 personnes d'ascendance européenne. L'incidence globale de la MVTE est plus élevée au sein des populations afro-américaines alors qu'elle est plus faible chez les asiatiques et les natifs américains. Par ailleurs, l'incidence d'EP (avec ou sans TVP) et de TVP seule (sans EP) est de l'ordre de 29 à 78, et de 45 à 117 cas, pour 100 000 personnes, respectivement (2). La MVTE représente la troisième cause de mortalité cardiovasculaire après l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral. En effet, le taux de mortalité est estimé à plus de 500 000 décès par an dans l'Union Européenne (500 millions d'habitants) et aux États-Unis (300 millions d'habitants) (1).

Près de 50% des cas de MVTE sont idiopathiques ou non provoqués, survenant de façon spontanée et sans facteur de risque identifiable. En revanche, les autres cas de MVTE sont provoqués par un ou plusieurs facteurs de risque classés en majeurs, modérés ou mineurs. Les facteurs de risque majeurs regroupent la chirurgie, le cancer, le traumatisme et l'immobilisation plâtrée. Concernant les facteurs de risque modérés, ils peuvent être héréditaires (déficits en protéines anticoagulantes, facteur V Leiden et variant de prothrombine G20210A) ou acquis (obésité, contraception orale, hormonothérapie substitutive et maladies inflammatoires de l'intestin). D'autre part, les mutations présentant une prévalence supérieure à 20% sont définies comme facteurs de risque mineurs de la MVTE (3). Cependant, ces facteurs de risque de MVTE sont associés à des risques de récurrence différents (Tableau 1).

**Tableau 1 : Stratification des facteurs de risque de la MVTE en fonction du risque de récurrence à long terme.** Tableau adapté de V Konstantinides et al. *European Heart Journal* 2019 (4).

Risque de récurrence à long terme	Catégorie des facteurs de risque de MVTE	Exemples
<b>Faible (&lt; 3% par an)</b>	Facteurs de risque majeurs réversibles ou transitoires (risque de MVTE > 10 fois)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chirurgie sous anesthésie générale (durée &gt; 30 min)</li> <li>• Hospitalisation et immobilisation (durée ≥ 3 jours) en raison d'une maladie aiguë ou de l'exacerbation d'une maladie chronique</li> <li>• Traumatisme avec fractures</li> </ul>
	Facteurs de risque mineurs réversibles ou transitoires (risque de MVTE ≤ 10 fois)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chirurgie mineure sous anesthésie générale (durée &lt; 30 min)</li> <li>• Hospitalisation (durée &lt; 3 jours)</li> <li>• Oestrogénothérapie et contraception orale</li> <li>• Grossesse et puerpéralité</li> <li>• Immobilisation (durée ≥ 3 jours) en raison d'une maladie aiguë</li> <li>• Blessure à la jambe sans fractures associée à une réduction de la mobilité (durée ≥ 3 jours)</li> <li>• Vol long courrier</li> </ul>
	Facteurs de risque mineurs persistants	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maladies inflammatoires de l'intestin</li> <li>• Maladies auto-immunes actives</li> </ul>
	Facteur de risque non identifié	-
<b>Élevé (&gt; 8% par an)</b>	Facteurs de risque majeurs persistants	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cancer actif</li> <li>• Un ou plusieurs épisodes précédents de MVTE en l'absence de facteurs de risque majeurs transitoires ou réversibles</li> <li>• Syndrome des anti-phospholipides</li> </ul>

## I.2. Complications

Les complications chroniques de la MVTE comprenant le syndrome post-thrombotique (SPT), l'hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (HTP-TEC) et la récurrence, altèrent considérablement la qualité de vie des patients.

La TVP peut induire une oblitération veineuse résiduelle par résorption incomplète du thrombus et une incontinence valvulaire favorisant le reflux sanguin. Ces deux séquelles entraînent une hausse de la pression veineuse qui est à l'origine de l'augmentation de la perméabilité

vasculaire. Il en résulte l'apparition d'œdème et le développement d'ulcérations cutanées caractérisant le SPT (5).

L'EP peut provoquer une occlusion des artères pulmonaires par du matériel fibrino-cruorique résiduel et un remodelage de la microcirculation pulmonaire. Ces deux mécanismes engendrent l'épaississement de la paroi des artérioles pulmonaires et l'augmentation de la pression au sein du lit vasculaire pulmonaire. D'où, l'apparition de dyspnée et la réduction de la tolérance à l'exercice caractérisant l'HTP-TEC (6).

Le risque de récurrence varie en fonction du temps écoulé depuis le premier événement thromboembolique. En effet, l'incidence de récurrence est la plus élevée au bout de 6 à 12 mois puis décroît avec le temps, soit 20 cas pour 1000 personnes à 1 an, 10 à 2 ans, 6 à 5 ans et 5 à 10 ans (2). Il a été démontré que la prolongation du traitement anticoagulant initial à distance de la phase aiguë de la MVTE non provoquée diminue le risque de récurrence. Pour cette indication, l'utilisation d'anticoagulants oraux directs (ACOD) à doses réduites s'avère efficace avec un rapport bénéfice/risque favorable (7).

### **I.3. Traitements**

Le traitement et la prophylaxie de la MVTE reposent sur les anticoagulants. Les antagonistes de la vitamine K (AVK), tels que la warfarine, étaient les seuls anticoagulants oraux utilisés pendant plus de 60 ans. Les AVK inhibent la synthèse dépendante de la vitamine K des facteurs de coagulation, y compris la prothrombine, le FVII, le FIX et le FX. Bien qu'ils soient efficaces, les AVK présentent plusieurs limitations. En effet, les interactions médicaments-médicaments ou médicaments-aliments et les polymorphismes génétiques influencent leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Par conséquent, la dose varie d'une personne à l'autre, impliquant une surveillance continue de l'INR (*International normalized ratio*) dont la valeur doit être comprise entre 2 et 3. Il était donc nécessaire de trouver de nouveaux anticoagulants qui pourraient être administrés à doses fixes sans besoin de surveillance. Ainsi, l'élucidation des structures cristallines de la thrombine et du FXa a permis de développer des molécules qui se lient avec une haute affinité et spécificité au site actif de ces enzymes (8) (9). Le ximélagatran, un inhibiteur réversible de la thrombine, était le premier ACOD autorisé pour usage clinique (10) (11). Cependant, il a été ensuite retiré du marché en raison d'une potentielle hépatotoxicité. Actuellement, quatre ACOD sont

disponibles sur le marché : un inhibiteur de la thrombine, le dabigatran, et trois inhibiteurs du FXa, le rivaroxaban, l'apixaban et l'édoxaban (Tableau 2). Le dabigatran étexilate est une prodrogue convertie en dabigatran par une estérase. Par contre, le rivaroxaban, l'apixaban et l'édoxaban sont des molécules actives. La biodisponibilité du dabigatran est de 6% alors que celles du rivaroxaban, de l'apixaban et de l'édoxaban dépassent les 50%. Le rivaroxaban et l'apixaban sont métabolisés par les cytochromes P450 (CYP450), tandis que le dabigatran et l'édoxaban le sont faiblement. C'est pourquoi, les concentrations plasmatiques du rivaroxaban et d'apixaban sont augmentées ou diminuées par les inhibiteurs ou les inducteurs des CYP450. De même, les ACOD sont des substrats de la pompe d'efflux, la glycoprotéine-P, qui favorise leur expulsion vers la lumière intestinale et empêche leur absorption. Ainsi, leurs concentrations plasmatiques peuvent être augmentées ou diminuées par les inhibiteurs ou les inducteurs de cette glycoprotéine. D'autre part, les AOCD sont éliminés par voies rénales et extrarénales. Les reins sont responsables de la clairance de 80% de dabigatran, 50% d'édoxaban, 33% de rivaroxaban et 27% d'apixaban. D'où, la nécessité d'adapter la posologie des AOCD chez les patients présentant une insuffisance rénale (12) (13) (14) (15) (16).

Le traitement anticoagulant de la MVTE comprend trois phases : un traitement initial de 5 à 10 jours, un traitement à long terme de 3 à 6 mois et un traitement prolongé au-delà de 6 mois. Le traitement initial a pour but de limiter l'extension du thrombus alors que les traitements à long terme et prolongé ont pour objectif de prévenir la récurrence. La classification des patients en fonction des facteurs de risque permet d'optimiser la durée du traitement. Ainsi, la durée du traitement des patients présentant des facteurs de risque transitoires ou réversibles est plus courte que celle des patients avec une MVTE non provoquée ou des facteurs de risque persistants. Le traitement traditionnel de la MVTE comprenait un anticoagulant parentéral, tel que l'héparine non fractionnée, l'héparine de bas poids moléculaire ou le fondaparinux, et un antagoniste de la vitamine K comme la warfarine. L'héparine non fractionnée et l'héparine de bas poids moléculaire se lient à l'antithrombine pour inactiver la thrombine et le FXa tandis que le fondaparinux catalyse l'inhibition du FXa. Étant donné que la warfarine nécessite plusieurs jours pour être efficace, l'anticoagulant parentéral était administré pendant au moins 5 jours. Une fois l'INR thérapeutique atteint, l'anticoagulant parentéral était arrêté et la warfarine était poursuivie pour une durée minimale de trois mois. Actuellement, la majorité des patients sont traités avec les ACOD qui sont aussi efficaces que la warfarine dans la prévention du risque de récurrence, tout en étant associés à moins de saignements. De même, les patients peuvent recevoir les ACOD directement ou 1 à 2 jours après l'anticoagulation parentérale. Dans

ce cas, de fortes doses de rivaroxaban et d'apixaban sont utilisées durant 21 et 7 jours, respectivement. D'autre part, les traitements thrombolytiques, tels que l'alteplase convertissant le plasminogène en plasmine, sont indiqués chez les patients présentant une embolie pulmonaire massive (1) (17) (18) (19) (20) (21) (22) .

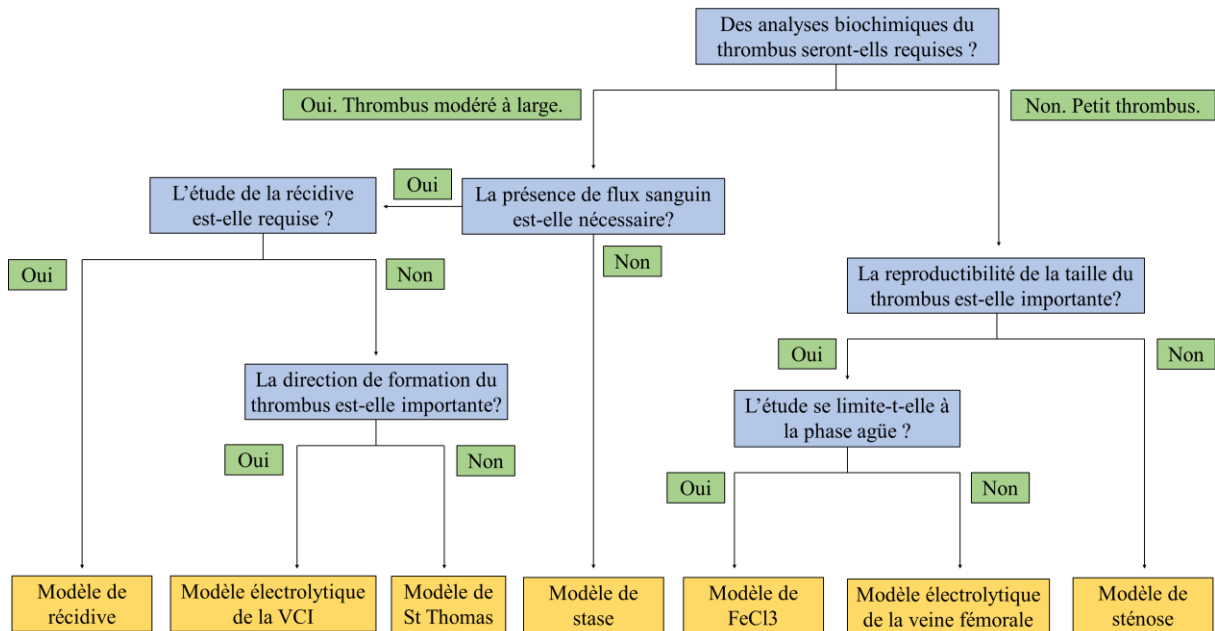
**Tableau 2 : Avantages et inconvénients des ACOD par rapport aux AVK (16).**

<b>Avantages</b>	<b>Implications</b>
Risque d'hémorragie intracérébrale réduit	Traitement sécurisé
Effet anticoagulant prévisible	Dose fixe et surveillance biologique non requise
Délai d'action rapide (1 à 4 heures)	Besoin réduit d'héparine
Durée d'action rapide ( $t_{1/2} \approx 12$ heures)	Besoin réduit d'antidote
Faibles interactions avec les médicaments et les aliments	Effet anticoagulant prévisible
<b>Inconvénients</b>	<b>Implications</b>
Prix élevé	Accès limité
Absence d'antidotes	Intervention urgente difficile
Absence de test de suivi standardisé	Identification difficile des patients hémorragiques
Clairance rénale	Contre-indication en cas d'insuffisance rénale
Excrétion fécale de la molécule active	Risque de saignement gastro-intestinal

## I.4. Modèles expérimentaux

Malgré l'efficacité des ACOD, les risques de saignements et de récurrence sont toujours présents. Il est donc nécessaire d'analyser les mécanismes moléculaires à l'origine de la MVTE afin de pouvoir développer des thérapies ciblées. Désormais, plusieurs modèles précliniques sont disponibles, permettant ainsi de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans la MVTE. Les études *in vivo* se font chez la souris, en raison du faible coût et de la présence de plusieurs modèles de souris transgéniques. Étant donné que les souris sont des quadrupèdes, elles ne développent pas spontanément de thrombose. Il faut donc l'induire chirurgicalement en utilisant l'un des modèles décrits ci-dessous (23). Néanmoins, le choix du modèle dépendra de la question scientifique à laquelle nous voulons répondre, comme le montre l'algorithme ci-

dessous décrit par Jose Diaz suite aux groupes de réflexion de l'ISTH (Figure 1). Quant aux tableaux 3 et 4, ils comparent les différentes caractéristiques des modèles murins (23) (24).



**Figure 1 : Algorithme de sélection du modèle de thrombose veineuse profonde.** Figure adaptée de Diaz et al. *ATVB* 2019 (24).



**Tableau 3 : Comparaison des techniques chirurgicales des différents modèles de thrombose veineuse profonde.** Tableau adapté de Diaz et al. *ATVB* 2019 (24).

<b>Modèle</b>	<b>Description</b>	<b>Incidence de thrombose</b>	<b>Taille du thrombus (coefficient de variation)</b>	<b>Références</b>
<b>Modèle de stase</b>	Ligature de la veine cave inférieure (VCI) et des veines collatérales antérieures. Cautérisation des veines collatérales postérieures.	95% - 100%	Large thrombus (< 10% de variation)	(25), (26), (27), (28), (29) et (30).
<b>Modèle de St Thomas</b>	Ligature partielle de la VCI avec application de deux pinces vasculaires. Interruption des veines collatérales antérieures	Incidence dépendante de la souche : Balbc > 90% ; C57BL6 75% - 80%	Thrombus modéré à large (20% de variation)	(31), (32), (33), (34), (35), (36), (37) et (38).
<b>Modèle de sténose</b>	Ligature partielle de la VCI sans induction de dommages endothéliaux.	40 - 100% (variable)	Thrombus petit à large (85% de variation)	(39), (40), (41) et (42).
<b>Modèle électrolytique de la VCI</b>	Application d'un courant électrique $\leq 250 \mu\text{A}$ sur la VCI pour une durée $\leq 15$ minutes. Ligature des veines collatérales antérieures.	100%	Taille dépendante de l'intensité du courant et de la durée d'application. Thrombus modéré à large (10% de variation)	(43), (44), (45), (46) et (47).
<b>Modèle de FeCl3</b>	Application d'un papier Whatman imbibé de FeCl3 sur la VCI.	100%	Taille dépendante de la concentration de FeCl3 et de la durée d'application. Petit thrombus (20% de variation)	(48) et (49).
<b>Modèle électrolytique de la veine fémorale</b>	Application d'un courant électrique de 1.5 à 3 V sur la veine fémorale pendant 30 secondes.	100%	Taille dépendante de l'intensité du courant et de la durée d'application. Petit thrombus (25% de variation)	(50), (51), (52), (53), (54), (55), (56) et (57).
<b>Modèle de récursive</b>	Première induction : Modèle électrolytique de la VCI. Deuxième induction (21 jours plus tard) : Modèle électrolytique de la VCI, stase ou sténose.	100%	Thrombus modéré à large (20% de variation)	(58)

**Tableau 4 : Comparaison des avantages et des inconvénients des différents modèles de thrombose veineuse profonde.** Tableau adapté de Diaz et al. *ATVB* 2019 (24).

<b>Modèle</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Références</b>
<b>Modèle de stase</b>	Reproductibilité de la taille du thrombus.	Impossibilité de tester des agents thérapeutiques en raison d'interruption du flux sanguin. Formation du thrombus en direction opposée au flux sanguin.	(25), (26), (27), (28), (29) et (30).
<b>Modèle de St Thomas</b>	Formation du thrombus en présence du flux sanguin.	Incidence de thrombose dépendante de la souche. Induction de dommages endothéliaux par les pinces vasculaires. Formation du thrombus en direction opposée au flux sanguin.	(31), (32), (33), (34), (35), (36), (37) et (38).
<b>Modèle de sténose</b>	Formation du thrombus en présence du flux sanguin. Variabilité similaire à celle observée chez l'homme.	Variabilité de l'incidence de thrombose et de la taille du thrombus.	(39), (40), (41) et (42).
<b>Modèle électrolytique de la VCI</b>	Formation du thrombus en direction du flux sanguin. Reproductibilité de la taille du thrombus. Possibilité de modifier l'intensité du courant ou la durée d'application pour répondre à différentes questions scientifiques.	Temps de chirurgie plus long.	(43), (44), (45), (46) et (47).
<b>Modèle de FeCl3</b>	Formation du thrombus en direction du flux sanguin. Possibilité de modifier la concentration de FeCl3 ou la durée d'application pour répondre à différentes questions scientifiques.	Étude de la phase aigüe ( $\leq 1$ h). Petit thrombus peu adéquat pour les analyses biochimiques.	(48) et (49).
<b>Modèle électrolytique de la veine fémorale</b>	Présence de valves dans la veine fémorale. Formation du thrombus en direction du flux sanguin. Possibilité de modifier l'intensité du courant ou la durée d'application pour répondre à différentes questions scientifiques.	Petit thrombus peu adéquat pour les analyses biochimiques.	(50), (51), (52), (53), (54), (55), (56) et (57).
<b>Modèle de récurrence</b>	Comparaison entre différents modèles utilisés pour la deuxième induction. Incorporation du premier thrombus dans la paroi vasculaire.	Soumission de la souris à deux chirurgies.	(58)

## II. Hémostase physiologique

### II.1. Mécanismes de l'hémostase

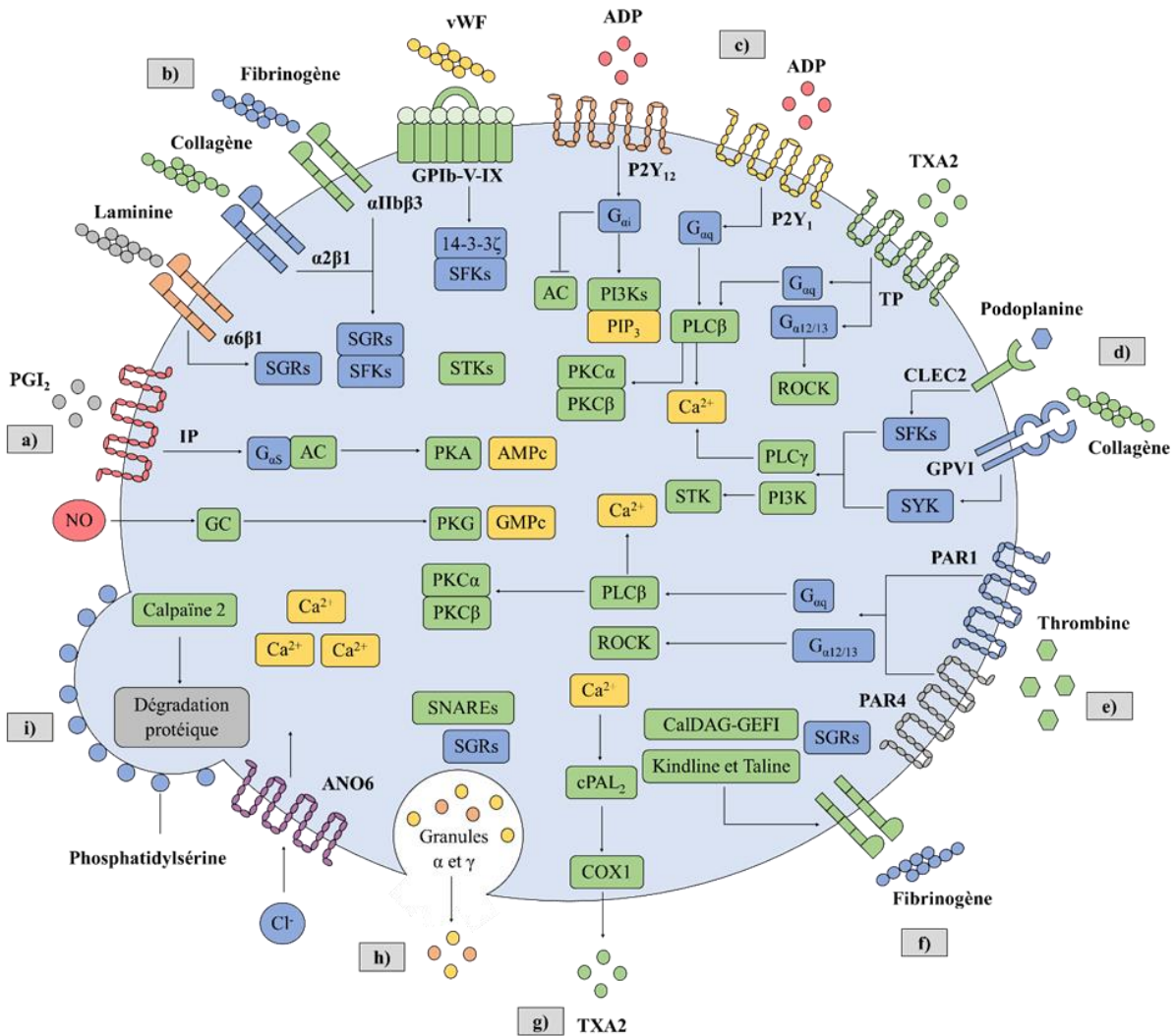
L'hémostase est un processus physiologique qui permet la restauration de l'intégrité endothéliale et l'arrêt du saignement survenant lors d'une brèche vasculaire. Ce processus impliquant les plaquettes et le système de coagulation, comprend trois phases : l'hémostase primaire, la coagulation plasmatique et la fibrinolyse physiologique (59).

#### II.1.1. Rôle des plaquettes

Les plaquettes représentent le deuxième composant sanguin majeur après les érythrocytes. Les plaquettes sont des cellules anucléées produites dans la moelle osseuse par fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes. Une fois libérées dans la circulation sanguine, elles ont une durée de vie de 7 à 10 jours. Les plaquettes contiennent trois types de granules : les granules  $\alpha$ , les granules  $\gamma$  ou denses et les lysosomes. Les granules  $\alpha$  sont les plus nombreuses et renferment des protéines, des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance contribuant à plusieurs fonctions plaquettaires. Les granules  $\gamma$  comportent de petites molécules, telles que l'adénosine diphosphate (ADP), la sérotonine, les polyphosphates, le glutamate, l'histamine et le calcium qui sont nécessaires à l'hémostase. Les lysosomes comprennent les glycohydrolases et des enzymes qui catalysent la dégradation des glycoprotéines, des glycolipides et des glycosaminoglycanes. L'hémostase primaire est caractérisée par le recrutement des plaquettes et leur adhésion au sous-endothélium. Cette adhésion est médiée par l'interaction entre les glycoprotéines plaquettaires GPIb-V-IX et GPVI, et les protéines matricielles correspondantes, le facteur von Willebrand (vWF) et le collagène. Il s'ensuit l'activation des plaquettes qui s'accompagne d'un changement morphologique et d'un relargage du contenu granulaire. Ainsi, les plaquettes deviennent sphériques, émettent des pseudopodes et présentent une réorganisation de leur cytosquelette (59) (60).

Différents médiateurs solubles amplifient la phase d'activation plaquettaire initiale en recrutant des plaquettes supplémentaires (Figure 2). La thrombine produite par la cascade de coagulation, est un puissant agoniste plaquettaire qui se fixe aux récepteurs PAR1 (*Protease-Activated Receptor1*) et PAR4. L'ADP se lie aux récepteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub>, l'épinéphrine, le facteur d'activation plaquettaire, la sérotonine, la vasopressine et les immunoglobulines G constituent

tous des facteurs potentialisant la phase d'activation plaquettaire. De plus, le thromboxane A2 (TXA2) est un agent vasoconstricteur et un inducteur d'agrégation plaquettaire, généré de façon séquentielle par plusieurs enzymes. En effet, l'acide arachidonique, clivé par la phospholipase A2, est soumis à l'action de la cyclooxygénase 1 (COX1) qui le convertit en prostaglandine H<sub>2</sub>. Cette dernière est transformée en TXA2 via la thromboxane-A synthase. D'autre part, la modification conformationnelle de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 augmente son affinité pour le fibrinogène, induisant la formation de ponts inter-plaquettaires. Quant à la thrombospondine, libérée par les granules  $\alpha$ , consolide l'agrégat plaquettaire via la glycoprotéine GPIV. Finalement, le phénomène de « flip-flop » conduit à l'exposition membranaire des phospholipides anioniques essentiels à la fixation des facteurs de coagulation. Ce phénomène fait intervenir une aminophospholipide translocase ou flippase permettant le transport des aminophospholipides vers le feuillet interne, une floppase favorisant leur externalisation et une scramblase responsable d'un transport aspécifique bidirectionnel (61).



**Figure 2 : Voies de signalisation plaquettaire.** **a)** L'inhibition plaquettaire est médiée par le monoxyde d'azote (NO) et la prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) agissant via la guanylate cyclase (GC) et l'adénylate cyclase (AC), respectivement. **b)** L'activation plaquettaire est initiée par l'interaction des récepteurs d'adhésion (intégrines α6β1, α2β1, αIIbβ3 et le complexe GPIIb-V-IX) avec leurs ligands correspondants (laminine, collagène, fibrinogène et vWF). La transduction du signal de ces récepteurs fait intervenir les SGRs, les SFKs et les STKs. **c)** La libération d'agonistes solubles, l'ADP et le thromboxane A2 (TXA2), active les récepteurs purinergiques (P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>1</sub> et TP). Le P2Y<sub>12</sub> agissant à travers la protéine G<sub>ai</sub>, inhibe l'AC et stimule les PI3Ks. Le P2Y<sub>1</sub> et le TP agissent à travers la protéine G<sub>aq</sub>, induisant la libération cytoplasmique du Ca<sup>2+</sup> et la stimulation des PKCs. Le TP active également la protéine G<sub>α12/13</sub>, favorisant ainsi la stimulation de la kinase ROCK. Cette dernière est impliquée dans les changements morphologiques et la diffusion des plaquettes. **d)** La GPVI et le CLEC2 amplifient l'activation plaquettaire via les SFKs et les SYKs. **e)** La thrombine est un puissant agoniste plaquettaire agissant via les récepteurs PAR1 et PAR4 couplés aux protéines G<sub>aq</sub> et G<sub>α12/13</sub>. **f)** L'augmentation d'affinité des intégrines, telles que αIIbβ3, est modulée par le CalDAG-GEFI. Les protéines d'adhésion focale, les kindlines et les talines, participent aussi au changement conformationnel des intégrines. **g)** La production de TXA2 est régulée par la cPLA<sub>2</sub> et la COX1. **h)** La sécrétion des granules α et γ dépend des SNAREs et des SGRs. **i)** Le remodelage membranaire caractérisé par l'exposition des phosphatidylsérines, est médié par le canal ionique ANO6. La calpaïne 2 contribue à la dégradation des protéines intracellulaires. ANO6, anoctamin 6; CalDAG-GEFI, Ca<sup>2+</sup> - and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide-exchange

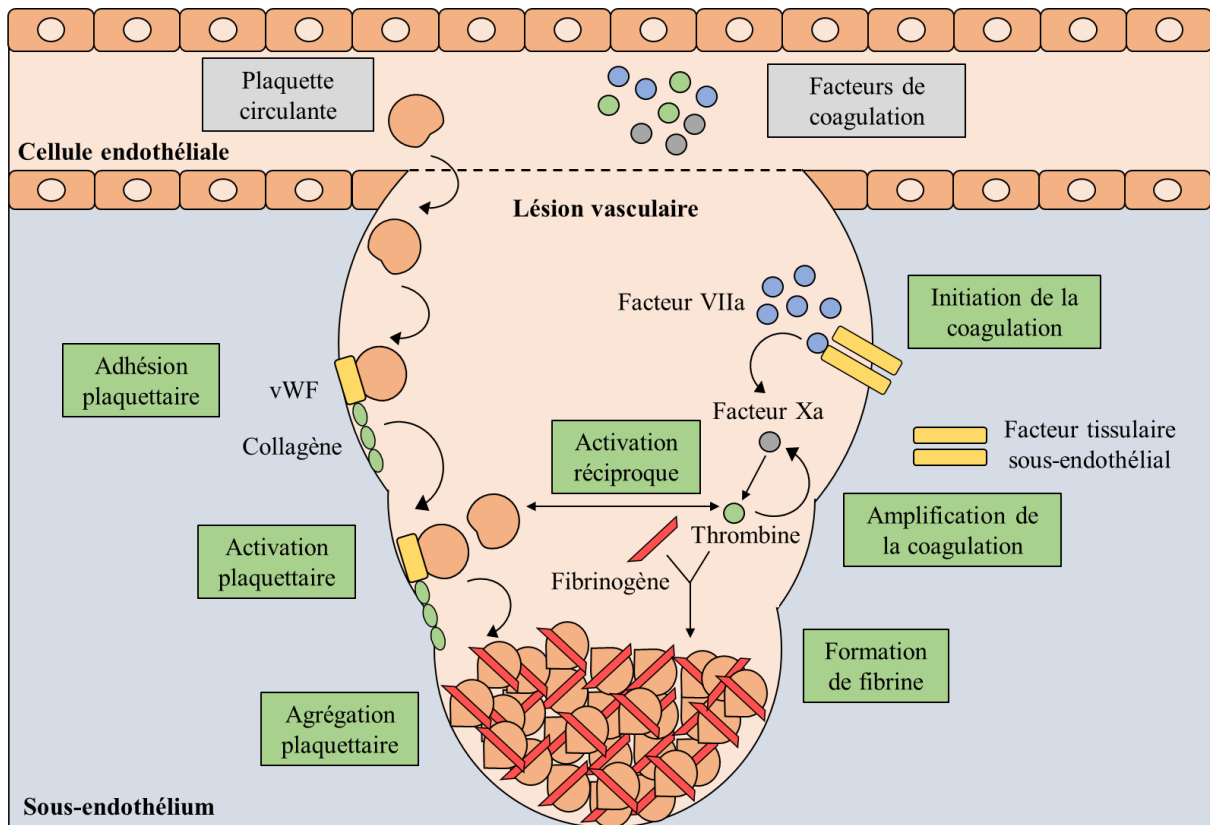
factor I; CLEC2, C-type lectin-like receptor 2; cPLA<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>-dependent and protein kinase-dependent activation of cytosolic phospholipase A2; PAR, Protease-activated receptor; PI3Ks, phosphoinositide 3-kinases; PKCs, protein kinases C; ROCK, Rho-associated protein kinase; SFKs, SRC-family kinases; SGRs, small G-protein regulators; SNAREs, soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein REceptor; STKs, serine/threonine-protein kinases; TP, TXA2 receptor; vWF, von Willebrand factor. Figure adaptée de van der Meijden et al. *Nature Reviews Cardiology* **2019** (61).

### **II.1.2. Rôle des systèmes de coagulation et de fibrinolyse**

La cascade de coagulation est initiée par l'exposition du facteur tissulaire (FT) à la surface cellulaire ou sous-endothéliale et son activation par la protéine disulfide isomérase (PDI), une enzyme sécrétée par les plaquettes et les cellules endothéliales. Le FT est exprimé à la surface des cellules endothéliales activées, des monocytes, des microparticules circulantes et du sous-endothélium. La liaison du FT au facteur VIIa forme le complexe ténase extrinsèque (FT-FVIIa), qui active le FX et le FIX. Il s'ensuit la liaison du FIXa au FVIII pour constituer le complexe (FIXa-FVIII), qui active également le FX. Le FXa, généré via les complexes (FT-FVIIa) et (FIXa-FVIII), s'associe au FV pour former le complexe prothrombinase (FXa-FV), qui convertit faiblement la prothrombine en thrombine (FIIa) (62) (63) (64).

En présence des facteurs V et VIII non activés, la quantité de FIIa est extrêmement faible. Par conséquent, la thrombine amplifie sa propre génération en activant les facteurs XI, VIII et V. Les complexes (FIXa-FVIIIa) et (FXa-FVa) vont alors agir de manière efficace et générer de larges quantités de thrombine. Quant au FXI, il participe à l'amplification de la voie endogène de coagulation via la formation du complexe ténase intrinsèque (FIXa-FVIIIa). Une fois formée, la thrombine stabilise le caillot en transformant le fibrinogène en fibrine (Figure 3) (62) (63) (64).

Finalement, la fibrinolyse est un processus physiologique qui favorise la résorption des caillots sous l'action de la plasmine. Cette dernière est produite sous une forme inactive, le plasminogène, au niveau du foie. La conversion du plasminogène en plasmine fait intervenir deux protéases à sérine, l'urokinase ou l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). Toutefois, le t-PA et l'urokinase peuvent être inactivés par les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène de type 1 et 2 (PAI-1 et PAI-2), alors que la plasmine peut-être inhibée par l' $\alpha$ 2-antiplasmine (65).



**Figure 3 : Phases de l'hémostase physiologique.** En cas de lésion vasculaire, l'hémostase primaire est déclenchée par le recrutement des plaquettes et leur adhésion au sous-endothélium. Il s'ensuit leur activation et leur agrégation qui est à l'origine de la formation du caillot plaquettaire. D'autre part, la cascade de coagulation est initiée par la formation du complexe ténase extrinsèque (FT-FVIIa) et est caractérisée par l'activation séquentielle des facteurs de coagulation. Cette cascade enzymatique génère donc la fibrine qui stabilise le caillot plaquettaire. Figure adaptée d'Engelmann et al. *Nature Reviews Immunology* **2013** (66).

### II.1.3. Régulation des mécanismes de l'hémostase

Le système de coagulation est finement contrôlé par des protéines anticoagulantes naturelles. Ces inhibiteurs physiologiques de la coagulation comprennent entre autres l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), le système de la protéine C, l'antithrombine (AT) et l'inhibiteur de protéases dépendant de la protéine Z (ZPI) (Figure 4) (67).

La phase d'initiation est régulée par le TFPI qui existe sous deux isoformes majoritaires  $\alpha$  et  $\beta$  résultant d'un épissage alternatif. Le TFPI $\alpha$  possède trois domaines Kunitz (K1, K2 et K3) ainsi qu'une extrémité C-terminale basique. En revanche, le TFPI $\beta$  présente deux domaines Kunitz (K1 et K2) attachés à un groupement C-terminal « glycosylphosphatidyl inositol » favorisant l'ancrage aux cellules endothéliales. Les plaquettes sécrètent uniquement le TFPI $\alpha$  alors que

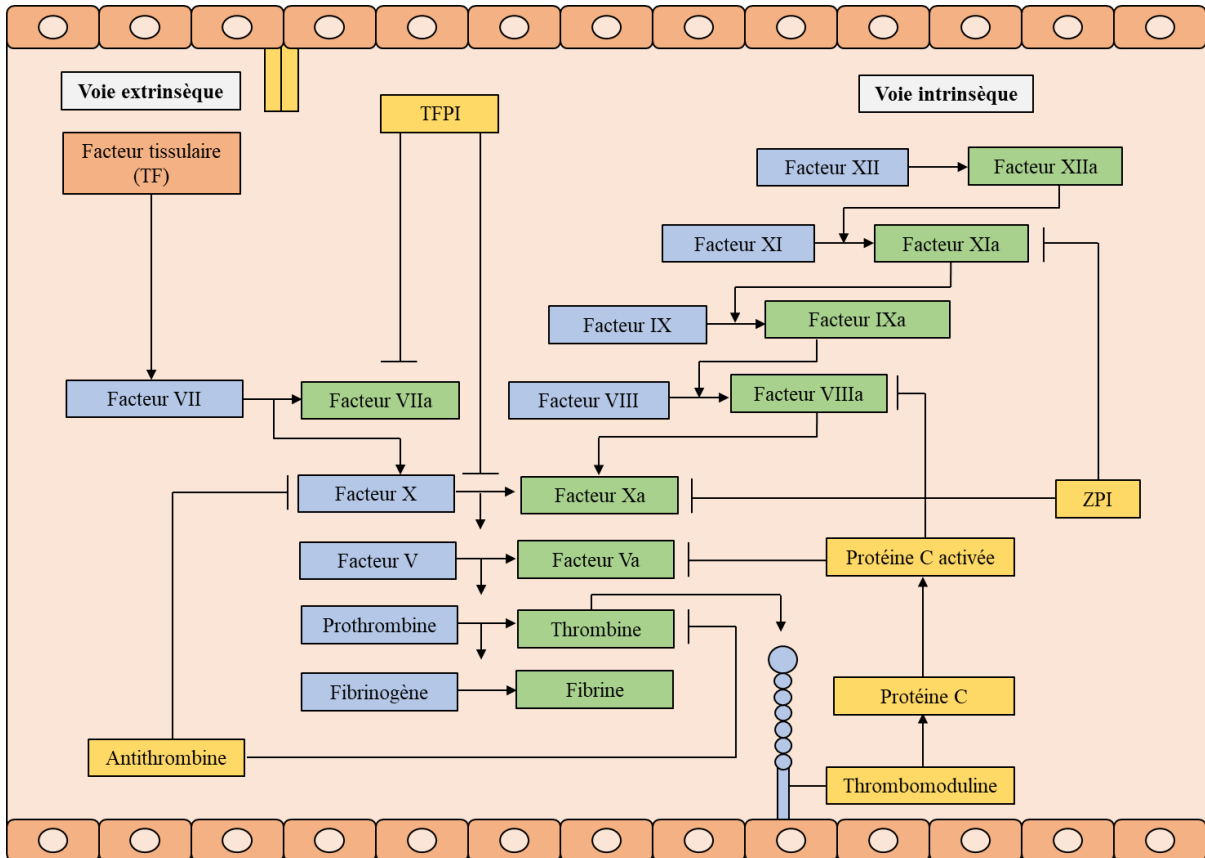
les cellules endothéliales produisent les deux isoformes. Les domaines K1 et K2 du TFPI $\alpha$  interagissent respectivement avec les facteurs VIIa et Xa pour former le complexe quaternaire FXa-TFPI-FVIIa-FXa inactif (68).

Le système de la protéine C comporte la protéine C (PC), son cofacteur la protéine S (PS), la thrombomoduline (TM) et l'EPCR (*Endothelial Protein C Receptor*). La PC est une protéine vitamine K-dépendante qui circule sous la forme d'un zymogène inactif. La fixation de la PC sur son récepteur endothélial EPCR favorise son clivage par la thrombine associée à la TM. Par suite, la PC acquiert une activité protéolytique vis-à-vis des facteurs Va et VIIIa, limitant la formation des complexes prothrombinase et ténase. Cette activité catalytique de la PC est modulée majoritairement par la PCI (*Protein C inhibitor*) et minoritairement par l' $\alpha$ 1-antitrypsine. D'autre part, la PS peut accélérer l'inhibition du FXa en interférant avec le domaine K3 du TFPI (69).

L'AT et le ZPI (*Protein Z-dependent protease inhibitor*) appartiennent à la famille des inhibiteurs de sérine protéases, les serpins. L'AT possède une boucle réactive à son extrémité C-terminale, lui permettant de former un complexe enzyme-inhibiteur covalent et irréversible. Ainsi, l'AT inhibe la thrombine, le FXa, le FVIIa, le FIXa et le FXIa (70). Quant au ZPI, il inactive le FXa à la surface des phospholipides, en présence du calcium et de la protéine Z mais peut également inhiber les facteurs IXa et XIa en l'absence de cofacteurs. Les activités inhibitrices d'AT et du ZPI sont fortement potentialisées par l'héparine (71).

D'autre part, la dérégulation de l'hémostase peut contribuer à l'hypercoagulabilité ou à l'hypocoagulabilité, qui sont à l'origine de thromboses ou de saignements. Ainsi, la MVTE peut résulter de troubles d'hypercoagulabilité, tels que les déficits congénitaux en protéines anticoagulantes (PC, PS et AT) et les mutations du facteur V Leiden et G20210A (72). La mutation du facteur V Leiden est caractérisée par la substitution nucléotidique d'une arginine par une glutamine en position 506 de la séquence protéique (R506Q). Ceci conduit à une résistance à la protéine C activée (PCa), augmentant ainsi le risque de MVTE de 3 à 5 fois à l'état hétérozygote, et jusqu'à 50 à 80 fois à l'état homozygote. Par ailleurs, les sujets porteurs de l'allèle de prothrombine G20210A présentent une mutation « gain de fonction », entraînant une amplification de la synthèse de prothrombine. Cette mutation provoque donc des taux plasmatiques élevés de thrombine et augmente le risque de MVTE de 3 fois dans la population générale (73).





**Figure 4 : Modulation des voies de coagulation par les protéines anticoagulantes.** La voie extrinsèque de coagulation est activée suite à l'exposition du facteur tissulaire. D'autre part, la voie intrinsèque de coagulation est stimulée par la liaison du facteur XII à des surfaces chargées négativement. Ces deux voies convergent vers la formation de la fibrine qui consolide le caillot plaquettaire. Les inhibiteurs physiologiques (représentés en jaune) agissent à différents niveaux de la cascade de coagulation pour limiter la génération de fibrine. Figure adaptée de C. Marshall et al. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003** (67).

## **III. Endothélium**

### **III.1. Structure de la paroi veineuse**

La paroi veineuse est composée de trois tuniques distinctes, disposées de manière concentrique autour de la lumière vasculaire : l'intima, la media et l'adventice. La tunique interne ou intima, qui est en contact direct avec le flux sanguin, est tapissée d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale. La tunique intermédiaire ou media est constituée de cellules musculaires lisses conférant à la veine son élasticité. Les cellules musculaires lisses sont toutefois moins nombreuses dans la paroi veineuse que dans la paroi artérielle, ce qui limite la contraction mais facilite la distension des veines. La tunique externe ou adventice est formée de tissu conjonctif et de fibres élastiques. Elle contient en outre des capillaires irriguant la paroi vasculaire (vasa vasorum) et des terminaisons nerveuses des systèmes autonomes sympathique et parasympathique. D'autre part, les veines sont munies de replis endothéliaux appelés valvules, favorisant le retour sanguin de la périphérie vers le cœur (74).

### **III.2. Fonctions physiologiques de l'endothélium**

L'endothélium contribue à l'homéostasie en régulant la perméabilité vasculaire, le tonus vasculaire, l'hémostase et la réponse inflammatoire.

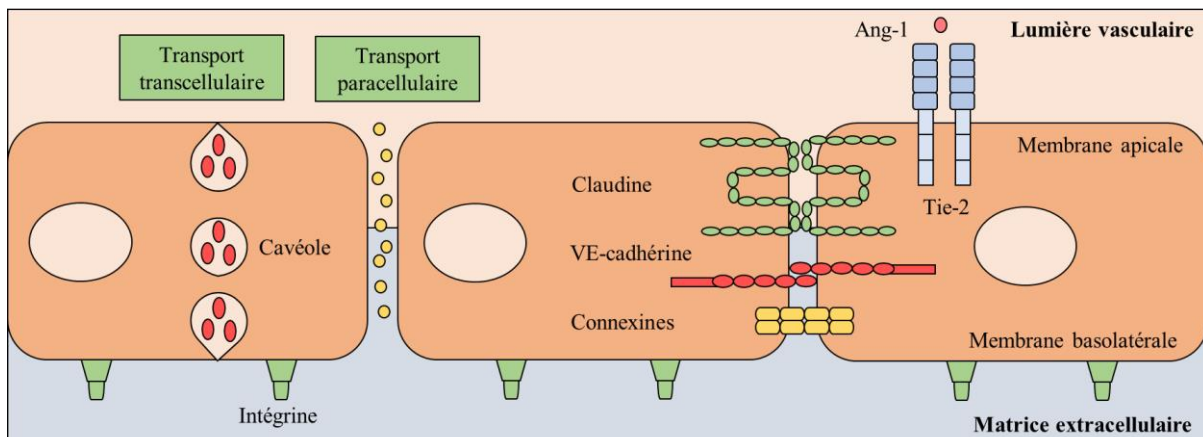
#### **III.2.1. Endothélium et perméabilité vasculaire**

Dans les cellules endothéliales quiescentes, le système angiopoïétine/Tie module l'intégrité vasculaire. En effet, l'angiopoïétine 1 (Ang-1) sécrétée par les péricytes, exerce des effets vasoprotecteurs en agissant comme agoniste du récepteur Tie2. Par contre, l'Ang-2 produite par les cellules endothéliales, antagonise les effets de l'Ang-1, augmentant ainsi la perméabilité vasculaire (75).

Afin de maintenir son intégrité et d'assurer ses fonctions, l'endothélium est doté de trois types de jonctions intercellulaires : serrées, communicantes et adhérentes (Figure 5). Ces jonctions diffèrent par leur rôle, leur localisation et leur aspect structural. Les jonctions serrées ou étanches situées au niveau apical, comportent différentes protéines transmembranaires, telles

que les occludines et les claudines. Elles contribuent à la polarisation des cellules endothéliales et contrôlent le passage des molécules dans l'espace intercellulaire. Les jonctions communicantes ou gap (connexines) sont composées de canaux étroits qui connectent les cytoplasmes des cellules adjacentes pour favoriser les échanges d'ions et de métabolites divers. Les jonctions adhérentes sont constituées de récepteurs transmembranaires, les cadhérines, qui relient les cellules entre elles via les interactions homophiliques de leurs domaines extracellulaires. Ces jonctions d'ancrage sont maintenues par le complexe Ang-1/Tie2 et participent à la cohésion mécanique (76) (77).

L'endothélium vasculaire forme une barrière contrôlant les échanges entre les compartiments sanguin et tissulaire. Les micromolécules traversent l'endothélium par diffusion paracellulaire à travers les jonctions serrées alors que les macromolécules requièrent un transport transcellulaire. La transcytose met en jeu des invaginations de la membrane plasmique appelées cavéoles. Ces dernières migrent à l'intérieur des cellules endothéliales et fusionnent avec la membrane basolatérale pour libérer leur contenu par exocytose dans le tissu interstitiel sous-jacent (78).



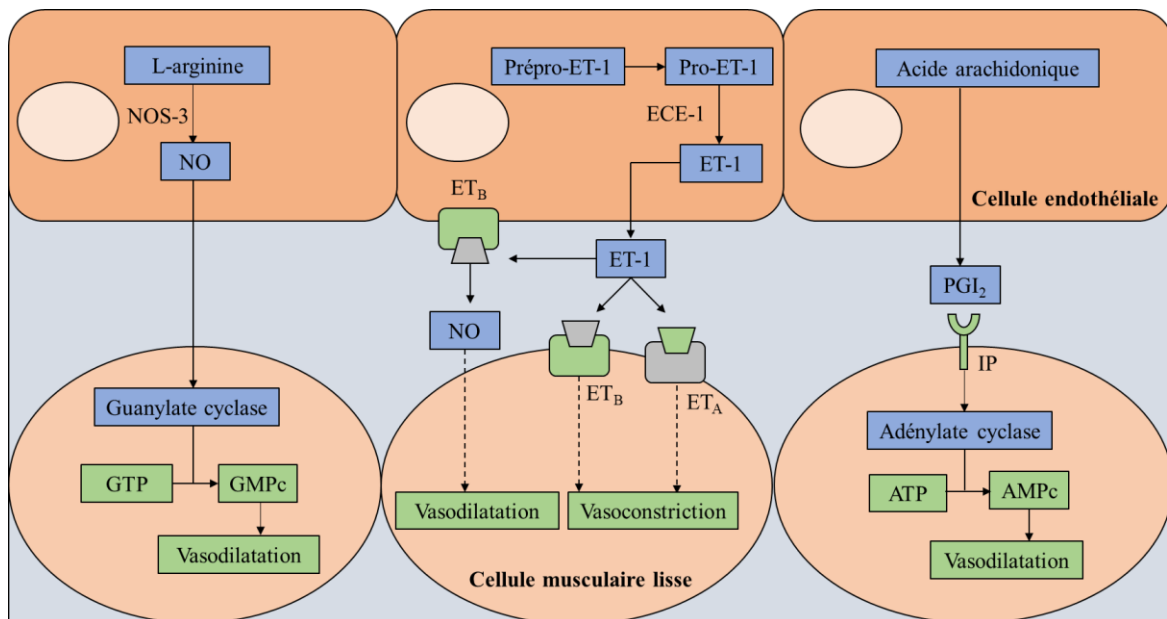
**Figure 5 : Contrôle de la perméabilité vasculaire.** Les cellules endothéliales sont munies de jonctions intercellulaires (VE-cadhérine, claudine et connexines) et sont ancrées à la matrice extracellulaire via des intégrines. Les transports des macromolécules et des micromolécules sont assurés par les voies transcellulaire et paracellulaire, respectivement. Le complexe Ang-1/Tie2 maintient l'homéostasie vasculaire en conservant l'intégrité de la barrière endothéliale. Figure adaptée d'Otsuka et al. *Nature Reviews Cardiology* 2012 (77).

### III.2.2. Endothélium et tonus vasculaire

Les cellules endothéliales régulent le tonus vasculaire en sécrétant des molécules vasodilatatrices comme le NO et la PGI<sub>2</sub> ainsi que des médiateurs vasoconstricteurs, tels que l'endothéline-1 (ET-1) (Figure 6) (79).

Le monoxyde d'azote est un radical libre produit par trois isoenzymes, les NO synthases (NOS). Ces enzymes héminiques consomment du NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) et de l'O<sub>2</sub> pour catalyser l'oxydation de la L-arginine en N-hydroxyarginine (NOHA), puis de celle-ci en NO. Ce médiateur produit par les isoformes constitutives NOS-1 et NOS-3 agit comme neurotransmetteur et agent vasodilatateur, respectivement. En revanche, le NO généré par l'isoforme inducible NOS-2 est impliqué dans la défense immunitaire en exerçant des effets cyostatiques et cytotoxiques. Au niveau vasculaire, les contraintes de cisaillement augmentent la concentration intracellulaire en ions calcium et activent la NOS-3, induisant la production du NO. Celui-ci provoque ainsi la relaxation des cellules musculaires lisses (CMLs) en stimulant la formation de GMP cyclique par la guanylate cyclase (80). Quant à la PGI<sub>2</sub>, c'est un eïcosanoïde obtenu par catabolisme oxydatif de l'acide arachidonique. Après fixation sur son récepteur IP exprimé par les CMLs, cette molécule active l'adénylate cyclase et augmente la concentration d'AMP cyclique intracellulaire responsable de la vasodilatation (81).

D'autre part, l'ET-1 synthétisée à partir de la préproendothéline agit au niveau de deux types de récepteurs : ET<sub>A</sub> présent à la surface des CMLs et ET<sub>B</sub> exprimé à la fois par les CMLs et les cellules endothéliales. La liaison d'ET-1 aux récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> localisés au niveau des CMLs active la phospholipase C. Il s'ensuit la libération du calcium des réservoirs intracellulaires et la vasoconstriction. Par contre, l'interaction d'ET-1 avec les récepteurs ET<sub>B</sub> des cellules endothéliales entraîne la vasodilatation via la production du NO (82).



**Figure 6 : Contrôle du tonus vasculaire.** Le NO et la PGI<sub>2</sub> contribuent à la vasodilatation en augmentant les taux de GMPc et d'AMPc, respectivement. En revanche, l'ET-1, issue de la pro-ET-1 sous l'action d'ECE-1 (*endothelin-converting enzyme-1*), induit la vasoconstriction en se fixant aux récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> des CMLs. Cependant, l'ET-1 peut entraîner la vasodilatation en se liant au récepteur endothélial ET<sub>B</sub>. Figure adaptée de M. T. Lau et al. *Nature Reviews Cardiology* **2017** (81).

### III.2.3. Endothélium et hémostasie

L'endothélium participe à l'hémostasie en présentant des propriétés procoagulantes, anticoagulantes et fibrinolytiques. À l'état quiescent, la surface luminale des cellules endothéliales est recouverte d'une fine couche composée de glycoprotéines chargées négativement, appelée le glycocalyx. Cette couche confère à l'endothélium des propriétés anti-adhésives et anticoagulantes, via la répulsion des molécules portant des charges négatives, telles que les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes. Les cellules endothéliales préviennent également l'adhésion plaquettaire en sécrétant la protéase ADAMTS13 (*a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13*) responsable du clivage du vWF (83). De plus, elles inhibent l'agrégation plaquettaire en produisant du NO et de la PGI<sub>2</sub> et en exprimant l'ectonucléotidase CD39 (70). En revanche, les cellules endothéliales induisent la voie extrinsèque de coagulation via l'expression du FT, en réponse à une brèche vasculaire. Toutefois, elles expriment des protéines anticoagulantes naturelles comme le TFPI, le système de la protéine C et l'antithrombine pour éviter l'hypercoagulabilité à l'origine du risque de thrombose. De même, elles contribuent à la résorption du caillot en sécrétant la protéase à

activité fibrinolytique, le t-PA (84). Ainsi, l'endothélium assure l'équilibre entre ses propriétés procoagulantes, anticoagulantes et fibrinolytiques pour maintenir l'homéostasie vasculaire.

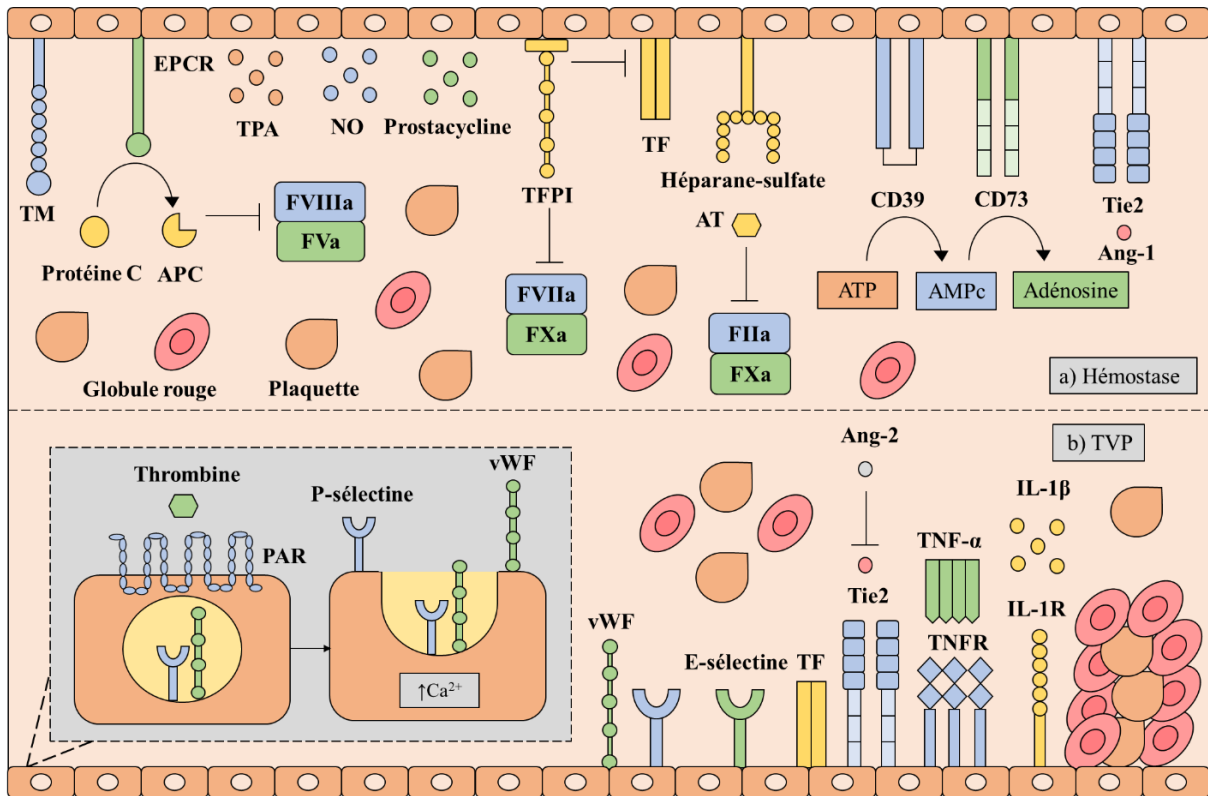
### **III.2.4. Endothélium et inflammation**

En condition inflammatoire, les cellules endothéliales participent au recrutement des leucocytes qui participent à l'élimination des agents infectieux. Sous l'influence des facteurs chimio-attractants, tels que les anaphylatoxines, les chimiokines et les médiateurs lipidiques, les leucocytes sont orientés vers le site inflammatoire. Le recrutement leucocytaire se déroule en plusieurs étapes et dépend des molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales. La première étape de migration est médiée par l'interaction réversible entre les sélectines présentes à la surface des cellules endothéliales et leurs ligands exprimés par les leucocytes. Il en résulte un ralentissement des leucocytes et leur roulement à la surface de l'endothélium, où ils établissent un contact étroit avec les chimiokines. Ces dernières favorisent l'arrêt des leucocytes en induisant un changement conformationnel des intégrines à leur surface. Il s'ensuit finalement la migration transendothéliale qui permet aux leucocytes d'accéder au milieu interstitiel (85) (86). En plus de leur rôle dans l'immunité innée, il a été démontré que les cellules endothéliales sont impliquées dans la réponse adaptative en présentant les antigènes aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) (87).

### **III.3. Dysfonction endothéliale et MVTE**

Outre l'hypercoagulabilité et la stase veineuse, la dysfonction endothéliale est la troisième composante de la triade de Virchow qui participe à la MVTE (Figure 7). L'activation endothéliale est caractérisée par l'exocytose des corps de Weibel-Palade et la libération du vWF et de la P-sélectine. Le vWF favorise le recrutement et l'adhésion plaquettaire, induisant la formation du thrombus veineux. En plus de sa capacité à promouvoir l'adhésion plaquettaire, le vWF se lie au FVIII et empêche son inactivation protéolytique. Certaines études cliniques suggèrent que le vWF contribue à la MVTE à travers sa fonction protectrice du FVIII, alors que d'autres considèrent le vWF et le FVIII comme deux facteurs de risque indépendants de la MVTE. Afin de déterminer le lien entre le vWF et le FVIII dans la MVTE, Brill et al. ont traité des souris déficientes en vWF (vWF<sup>-/-</sup>) avec du FVIII et leur ont ensuite induit la thrombose veineuse en utilisant le modèle de sténose. La restauration du FVIII ne conduit pas au

développement de thrombus veineux, soulignant un rôle prothrombotique du vWF indépendant du FVIII (39). Une étude de cohorte a montré que des variants génétiques altérant le taux plasmatique de vWF sont associés à l'incidence de la MVTE, confirmant l'importance de ce facteur dans la MVTE (88). D'autre part, les cytokines et les chimiokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules endothéliales ou exerçant une action sur elles, jouent un rôle crucial dans la MVTE. Par exemple, l'IL-6 et l'IL-17 activent les cellules endothéliales en augmentant l'expression des molécules d'adhésion. D'un autre côté, la sécrétion de CXCL2 et de CCL2 par les cellules endothéliales facilitent le recrutement des neutrophiles et des monocytes (Annexe) (89). La coopération entre l'endothélium et les cellules immunitaires, telles que les monocytes et les neutrophiles, sera détaillée dans la partie immunothrombose. En plus de leur fonction chimio-attractante, les cytokines et les chimiokines augmentent la perméabilité vasculaire et réduisent les propriétés anticoagulantes endothéliales en dégradant le glycocalyx (90). Outre les médiateurs inflammatoires, le facteur de transcription KLF2 (*Krüppel-like factor 2*) régule l'activité antithrombotique de la surface endothéliale, en induisant l'expression de la TM et de la NOS ainsi qu'en inhibant celles du PAI-1 et du TF. Au cours de la stase veineuse, la diminution d'expression de KLF2 est associée à une activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor-kappa B*). Il en résulte une dysfonction endothéliale qui se traduit par une augmentation d'expression du PAI-1, du TF et des molécules d'adhésion, telles que VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Protein 1*), ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) et E-sélectine (91). Quant à l'Ang-2, elle intervient aussi dans la dysfonction endothéliale en inhibant la néovascularisation et en favorisant la fibrose vasculaire. En effet, il a été démontré que l'administration continue d'Ang-2 à des souris ayant subi la thrombose veineuse profonde retarde la résorption du thrombus (92).



**Figure 7 : Contribution de l'endothélium à l'hémostase et à la TVP. a)** Au cours de l'hémostase, l'endothélium limite la coagulation en exprimant des protéines anticoagulantes naturelles, y compris le système de la protéine C, le TFPI et l'antithrombine se liant à l'héparane sulfate. De plus, il prévient l'agrégation plaquettaire via les endonucléotidases CD39 et CD73 qui catalysent la dégradation d'ATP. Quant à l'axe, Ang-1/Tie2, il préserve l'intégrité vasculaire. **b)** En revanche, l'endothélium présente des propriétés procoagulantes et pro-inflammatoires durant la TVP. L'interaction entre la thrombine et son récepteur endothélial PAR induit la libération du vWF et de la P- sélectine des corps de Weibel-Palade. Les actions pro-inflammatoires des cytokines TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont médiées à travers leurs récepteurs endothéliaux, TNFR et IL-1R. D'autre part, l'Ang-2 altère l'intégrité de la barrière endothéliale en antagonisant l'Ang-1. Figure adaptée d'E. Colling et al. *Circulation Research* **2021** et d'A. Van der Ent MS et al. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* **2022** (84) (90).



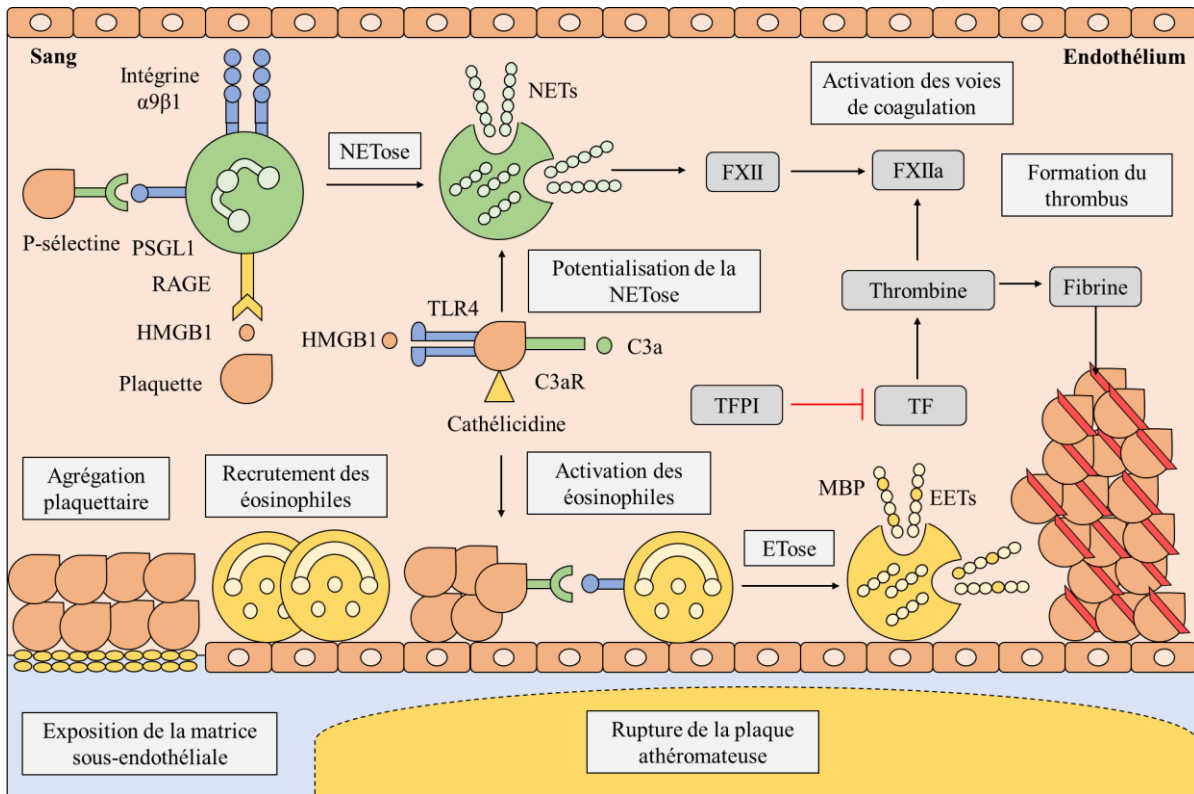
## IV. Thromboinflammation

En plus des trois composants de la triade de Virchow, des travaux de recherche ont mis en évidence un rôle important de l'inflammation dans la thrombose veineuse profonde (40). En effet, la thrombose et l'inflammation sont deux phénomènes distincts, toutefois une interdépendance entre ces mécanismes a été révélée durant la dernière décennie. En réponse à un agent infectieux, l'interaction entre les cellules immunitaires innées et les plaquettes déclenche le système de coagulation afin de limiter la dissémination du pathogène. Ce processus physiologique connu sous le nom d'immunothrombose, est un mécanisme de défense favorisant la séquestration et l'élimination du pathogène. Cependant, l'activation excessive et aberrante de l'immunothrombose pourrait conduire à la thromboinflammation, un processus pathologique caractérisé par un phénotype prothrombotique. Des études récentes ont montré que la thromboinflammation contribue non seulement à des complications thrombotiques lors des maladies infectieuses aiguës, mais intervient également dans plusieurs maladies cardiovasculaires en conditions stériles (93). En fonction de la pathologie cardiovasculaire, la thromboinflammation pourrait être induite par des stimuli différents. Par exemple, l'inflammation chronique, la rupture de la plaque athéromateuse et la stase veineuse pourraient déclencher la thromboinflammation dans l'athérosclérose, la thrombose artérielle et la maladie veineuse thromboembolique, respectivement (94) (95) (96). De nos jours, les anticoagulants interférant avec le système de coagulation, sont utilisés dans le traitement et la prophylaxie des thromboses. Cependant, ces traitements présentent un risque de saignement important, impliquant leur association à des thérapies ciblées adjuvantes, telles que les anti-inflammatoires. Dans cette partie, je comparerai d'abord l'ensemble des mécanismes inflammatoires intervenant dans les thromboses artérielles et veineuses, puis je détaillerai le rôle des systèmes immunitaires inné et acquis participant à la MVTE.

### a) Thromboinflammation dans la thrombose artérielle

La thrombose artérielle peut être initiée par la rupture de la plaque athéromateuse, entraînant l'exposition du sous-endothélium et la libération du facteur tissulaire (Figure 8). Il en résulte l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium à travers les complexes GPIIb/IIIa-vWF et GPVI-collagène. Il a été démontré que l'intégrine  $\alpha_9\beta_1$  exprimée par les neutrophiles joue un rôle crucial dans la thrombose artérielle in vivo. En effet, la déficience myéloïde en  $\alpha_9\beta_1$  réduit la thrombose artérielle en atténuant la NETose, l'agrégation plaquettaire et la libération de la cathepsine G (97). La NETose correspond à l'expulsion de filaments d'ADN procoagulants

recouverts d'histones et d'enzymes intracellulaires, appelés NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*), par les neutrophiles (98). D'autre part, la cathepsine G également produite par les neutrophiles, contribue à l'activation plaquettaire et au recrutement des leucocytes au niveau de la paroi artérielle (99). De même, la cathélicidine générée par les neutrophiles, participe à l'activation plaquettaire en interférant avec la molécule GPVI, les protéines tyrosines kinases SRC et SYK, ainsi que la phospholipase C1 (100). Par rétrocontrôle positif, les plaquettes activées produisent la protéine HMGB1 (*high mobility group protein B*) qui stimule la NETose en se liant au récepteur RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) exprimé à la surface des neutrophiles (101) (102). De plus, la HMGB1 active les plaquettes par l'intermédiaire de la voie TLR4-MyD88 et l'inhibition de cette protéine est associée à une diminution de la thrombose artérielle (103). D'autre part, il a été démontré que l'induction de la thrombose artérielle in vivo via l'application du FeCl<sub>3</sub> au niveau de l'artère carotide, entraîne le recrutement et l'adhésion endothéliale des éosinophiles à travers des intégrines. L'activation de ces éosinophiles est médiée par les plaquettes d'une manière dépendante de la P-sélectine et s'accompagne d'une libération des filaments d'ADN, appelés EETs (*eosinophil extracellular traps*), associés à des protéines granulaires éosinophiliques, telles que la MBP (*major basic protein*) (104). Ainsi, les NETs et les EETs exercent leurs effets prothrombotiques en activant les voies intrinsèque et extrinsèque de coagulation, respectivement (98) (104). Outre leur rôle procoagulant, les NETs stimulent le système du complément qui exacerbe les dommages endothéliaux et potentialise l'activation plaquettaire. Ainsi, la déficience en C3 réduit la thrombose artérielle en bloquant l'axe C3a-C3aR (*C3a receptor*) responsable de l'activation plaquettaire via RAP1B (*RAS-related protein*) (105) (106).

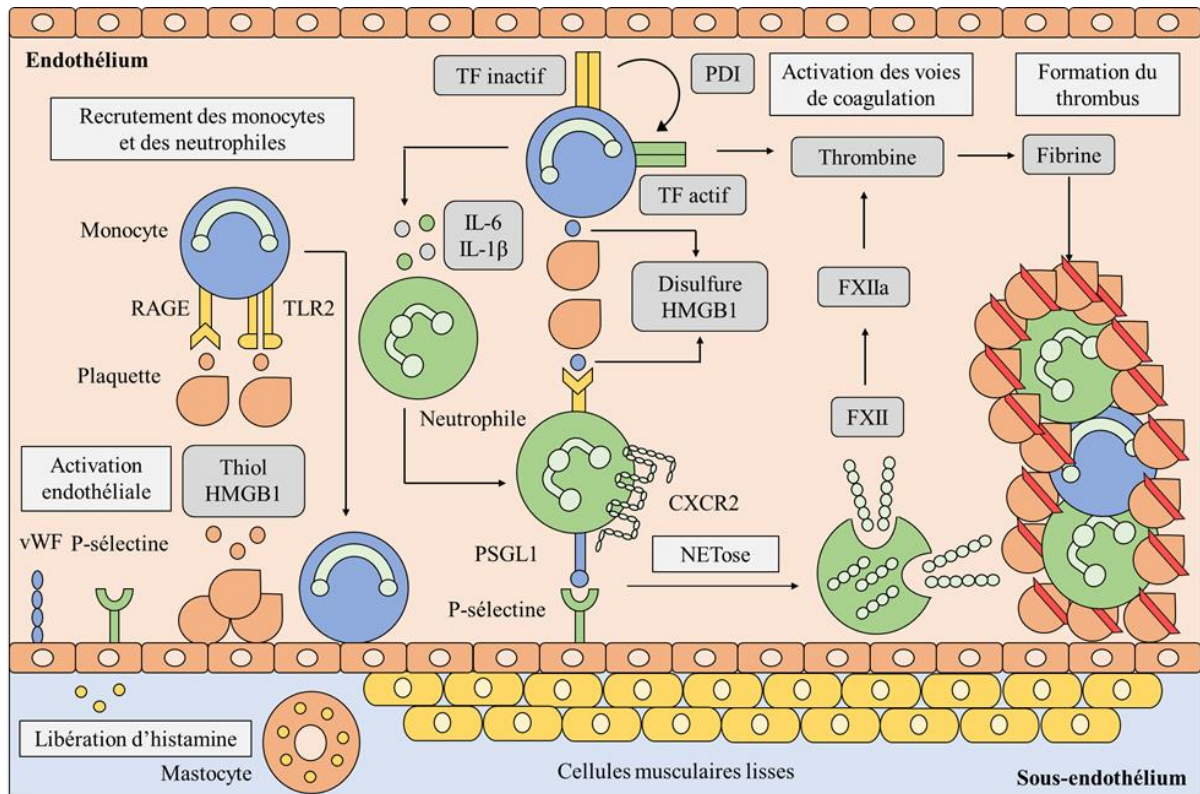


**Figure 8 : Coopération entre les plaquettes, les neutrophiles et les éosinophiles dans la thrombose artérielle.** Suite à l'érosion ou la rupture de la plaque athéromateuse, l'intégrité de la barrière endothéliale est altérée. Il en résulte l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale exposée et leur agrégation. La fixation de la protéine HMGB1 au récepteur RAGE, l'interaction entre la P-sélectine et son ligand PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*), et la liaison de l'intégrine  $\alpha9\beta1$  à la molécule d'adhésion VCAM-1, activent la NETose. D'autre part, la cathélicidine, le complexe C3a-C3aR et l'axe HMGB1-TLR4 stimulent les plaquettes. Une fois activées, les plaquettes potentialisent la NETose et induisent l'ETose. Par conséquent, les NETs initient la voie intrinsèque de coagulation alors que les EETs déclenchent la voie extrinsèque de coagulation et contribuent à l'agrégation plaquettaire via la protéine granulaire MBP (*major basic protein*). Figure adaptée de Stark et al. *Nature Reviews Cardiology* **2021** (93).

### b) Thromboinflammation dans la thrombose veineuse profonde

Bien que les thromboses artérielles et veineuses surviennent toutes deux dans des conditions stériles, elles se distinguent par la composition de leurs thrombi et leurs mécanismes inflammatoires et prothrombotiques. Le thrombus veineux de couleur rouge est riche en érythrocytes et en fibrine, alors que le thrombus artériel de couleur blanche est riche en plaquettes (107). Contrairement à la thrombose artérielle survenant suite à la rupture de la plaque athéromateuse, l'intégrité endothéliale est préservée dans la thrombose veineuse (Figure 9). Cette dernière n'est donc pas induite par l'exposition du sous-endothélium et l'adhésion plaquettaire, mais plutôt par la stase veineuse activant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Il s'ensuit

l'augmentation d'expression des molécules d'adhésion à la surface endothéliale, telles que VCAM-1, ICAM-1 et P-sélectine, qui sont à l'origine du recrutement leucocytaire (108). Ainsi, les monocytes et les neutrophiles recrutés contribuent à l'initiation et à la progression de la MVTE, via l'expression du facteur tissulaire et l'induction de la NETose. Des études ont montré que la neutropénie et la désintégration des NETs réduisent la thrombose veineuse, soulignant un rôle prothrombotique important des neutrophiles (40). En plus de l'activation de la voie intrinsèque de coagulation, les neutrophiles participent à la MVTE en stimulant l'agrégation plaquettaire. En effet, l'administration *in vitro* et *in vivo* d'un glycomimétique de PSGL-1, la molécule P-G6, inhibe la fixation de PSG-L1 exprimée par les neutrophiles à la P-sélectine plaquettaire. Il en résulte la diminution de l'agrégation plaquettaire et l'inhibition de la thrombose veineuse sans altération de l'hémostase (109). Cependant, l'activation du système immunitaire inné ne résulte pas uniquement de l'expression des molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement leucocytaire. C'est pourquoi, Stark et al. suggèrent que la réduction du flux sanguin s'accompagne d'une hypoxie similaire à celle observée dans les conditions de fortes altitudes. Dans ce cas, le facteur HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ) pourrait stimuler l'expression de l'inflammasome NLRP3 par les cellules endothéliales et favoriser la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  (110). D'autre part, les mastocytes contribuent aussi à la thrombose veineuse en relargant des médiateurs inflammatoires, en particulier l'histamine. Il s'ensuit l'activation des cellules endothéliales qui se traduit par la libération de la P-sélectine et du vWF par les corps de Weibel-Palade (111). Par ailleurs, Stark et al. ont révélé un rôle procoagulant de la protéine HMGB1 médié par les récepteurs RAGE, TLR2 et TLR4 dans la thrombose veineuse. En effet, cette protéine active les voies intrinsèque et extrinsèque de coagulation en induisant la NETose et l'expression du facteur tissulaire par les monocytes, respectivement (102). D'autres mécanismes participant à la NETose ont été également identifiés, tels que la coopération entre PSGL-1 et le récepteur CXCR2 des neutrophiles et la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK (112) (113).



**Figure 9 : Interaction entre les plaquettes, les neutrophiles et les monocytes dans la thrombose veineuse profonde.** La réduction du flux sanguin stimule la sécrétion d’histamine par les cellules mastocytaires. Il s’ensuit l’activation des cellules endothéliales qui se manifeste par l’augmentation d’expression du facteur von Willebrand et de la P-sélectine. Le recrutement des monocytes est médié par la liaison de la protéine thiol HMGB1 aux récepteurs RAGE et TLR2. D’autre part, la protéine disulfure HMGB1 amplifie la réponse inflammatoire en favorisant la production de médiateurs pro-inflammatoires par les monocytes, tels que l’IL-6 et l’IL-1 $\beta$ . De plus, cette protéine déclenche les voies de coagulation en induisant la NETose et en activant le facteur tissulaire via la protéine disulfure isomérase (PDI). Figure adaptée de Stark et al. *Nature Reviews Cardiology* **2021** (93).

## **IV.1. Système immunitaire inné dans la MVTE**

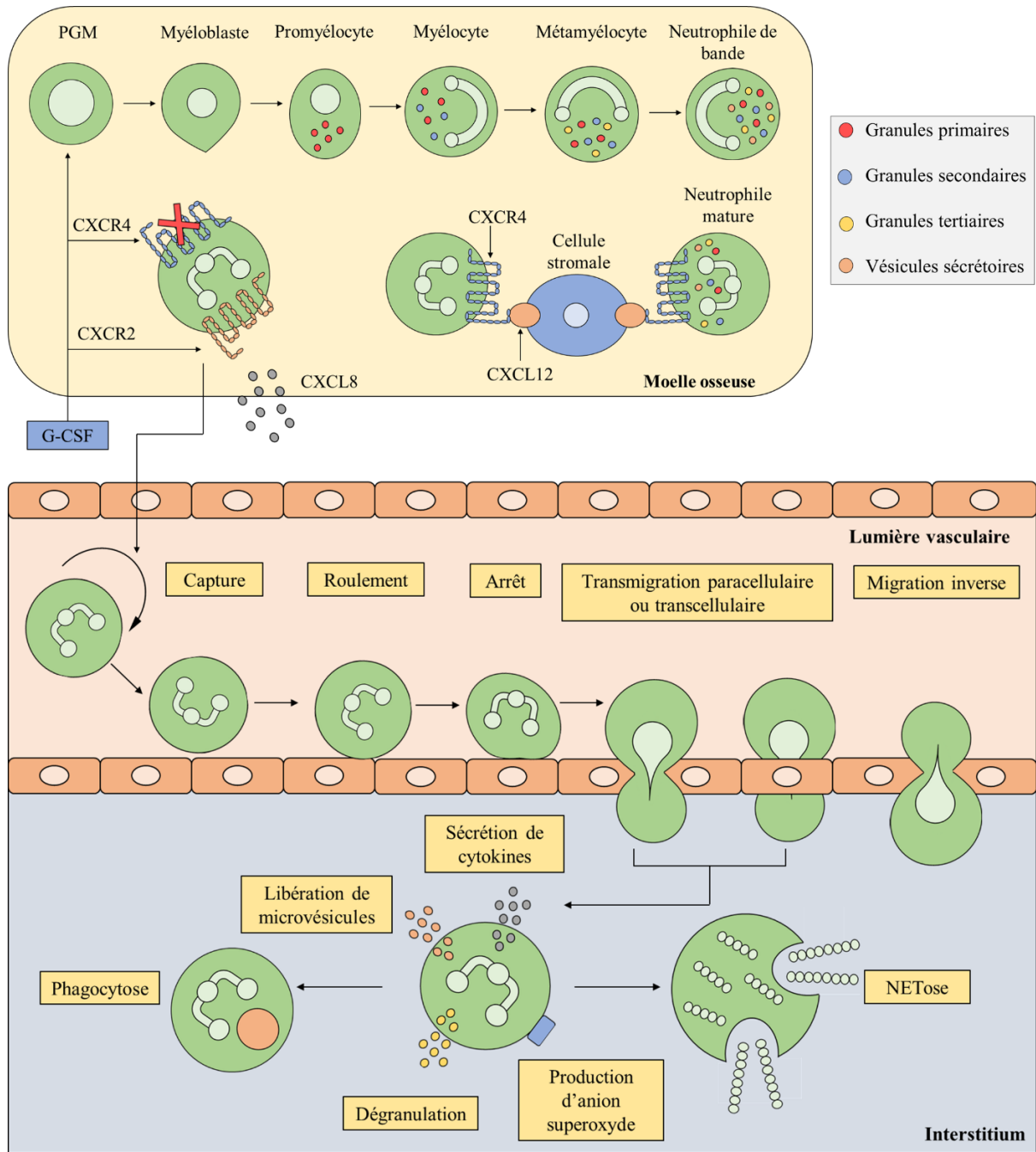
### **IV.1.1. Neutrophiles**

#### **IV.1.1.1. Généralités sur les neutrophiles**

Les neutrophiles sont produits au niveau de la moelle osseuse par granulopoïèse. Ce processus débute par la différenciation d'une cellule souche hématopoïétique en un progéniteur multipotent, qui donne naissance aux progéniteurs myéloïdes communs ou aux progéniteurs lymphoïdes communs (114). Les progéniteurs granulocytes-macrophages (PGM), dérivés des progéniteurs myéloïdes communs, vont se différencier successivement en myéloblastes, promyélocytes, myélocytes et métamyélocytes afin de former les neutrophiles matures (115). Au cours de la granulopoïèse, les molécules impliquées dans les fonctions des neutrophiles sont générées et stockées dans des granules (116). Nous distinguons :

- Les granules azurophiles ou primaires formés au stade de promyélocyte et contenant la myéloperoxydase (MPO).
- Les granules spécifiques ou secondaires produits au stade de myélocyte et renfermant la lactoferrine.
- Les granules tertiaires synthétisés au stade de métamyélocyte et comprenant la gélatinase.
- Les vésicules de sécrétion obtenues par endocytose au stade de neutrophiles matures et comportant les molécules d'adhésion.

Le développement, la production et la mobilisation des neutrophiles vers la circulation sanguine sont orchestrés par le G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) (117). La rétention des neutrophiles dans la moelle osseuse est favorisée par l'interaction entre CXCL12 (*C-X-C motif chemokine ligand 12*) et CXCR4 (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 4*), alors que leur mobilisation est médiée par CXCR2. Le G-CSF contribue à la libération des neutrophiles de la moelle osseuse en réduisant l'expression de CXCR4 et en augmentant celle de CXCR2 (Figure 10) (118). En revanche, les neutrophiles sénescents retournent à la moelle osseuse suite à l'augmentation de l'expression de CXCR4. Il s'ensuit la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages médullaires qui vont à leur tour sécréter du G-CSF. Ce rétrocontrôle positif maintient l'homéostasie immunitaire en restaurant le taux sanguin de neutrophiles (119).



**Figure 10 : Développement et fonctions des neutrophiles.** Le G-CSF régule le développement des neutrophiles dans la moelle osseuse et leur mobilisation vers la circulation sanguine. En présence d'agents infectieux ou d'autres stimuli, les neutrophiles sont recrutés au site inflammatoire. Au niveau tissulaire, ils exercent plusieurs fonctions pour éliminer les microorganismes ou promouvoir la réponse inflammatoire, comme par exemple, la sécrétion de molécules anti-bactériennes et la production de NETs. Figure adaptée de Németh et al. *Nature Reviews Drug Discovery* 2020 (120).

En réponse à un agent infectieux ou à un dommage tissulaire, les neutrophiles migrent de la circulation sanguine vers le foyer inflammatoire. L'activité microbicide des neutrophiles repose sur les mécanismes de phagocytose, de dégranulation, d'explosion oxydative et de NETose.

La détection d'un pathogène par le neutrophile peut être directe grâce à la liaison des PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) aux PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), ou indirecte via l'opsonisation. Cette dernière consiste à recouvrir la surface du pathogène par des immunoglobulines ou des molécules du complément pour faciliter son interaction avec le neutrophile. Après reconnaissance de sa cible, le neutrophile émet des pseudopodes qui englobent le pathogène, formant ainsi le phagosome.

Suite à son internalisation par le neutrophile, la destruction du pathogène peut être dépendante ou indépendante de l'oxygène. Le système indépendant de l'oxygène est induit par la mobilisation des granules et leur fusion avec le phagosome pour former le phagolysosome, au sein duquel les molécules microbicides sont déversées. Par contre, le système dépendant de l'oxygène consiste en une conversion de l'oxygène en anion superoxyde ( $O_2^-$ ) par la NADPH oxydase, enzyme exprimée au niveau de la membrane plasmique du neutrophile. Il s'ensuit la transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), sous l'action de la superoxyde dismutase. En présence d' $H_2O_2$  et d'anions chlorures ( $Cl^-$ ), la MPO génère l'acide hypochloreux (HOCl), ayant un puissant pouvoir antibactérien.

La NETose est un mécanisme caractérisé par la libération des NETs qui correspondent à des filaments d'ADN recouverts d'histones et d'enzymes intracellulaires, telles que la MPO et l'élastase (*Neutrophil Elastase, NE*) (121). Les NETs séquestrent et neutralisent les microorganismes, limitant ainsi leur dissémination. En effet, il a été démontré que la dégradation des NETs par l'ADNase augmente le taux de bactériémie suite à une infection cutanée à *Staphylococcus Aureus* (122). Cependant, les microorganismes présentent trois mécanismes d'évasion : l'encapsulation, la sécrétion d'endonucléases désintégrant les NETs et la conversion des produits dérivés des NETs en molécules cytotoxiques provoquant l'apoptose des cellules immunitaires (98).

En fonction de la nature des stimuli, nous distinguons deux mécanismes de NETose : la NETose suicidaire tardive qui conduit à la mort du neutrophile et la NETose vitale précoce qui permet l'expulsion des NETs sans affecter la viabilité cellulaire (123).

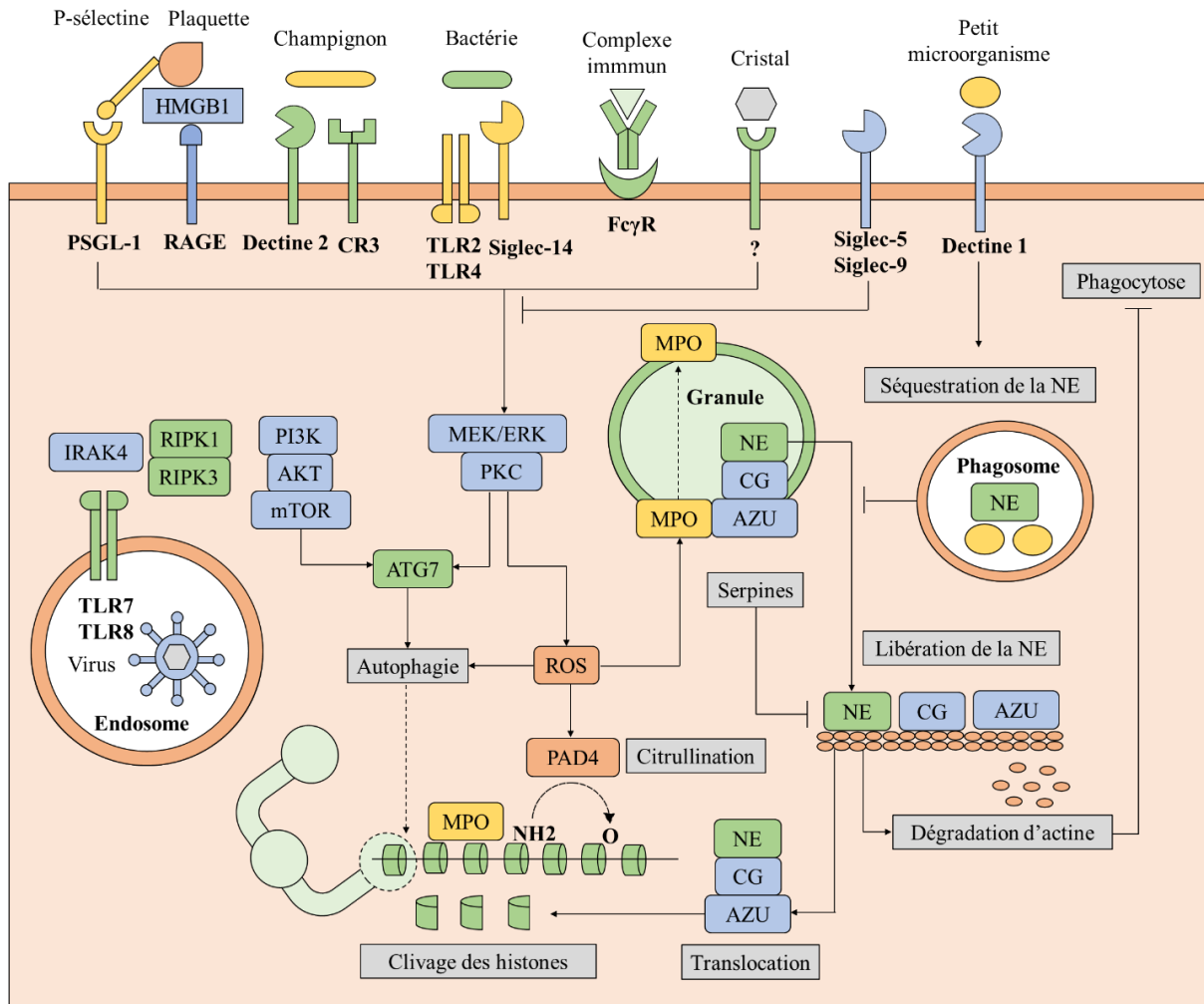
Le phorbol myristate acétate (PMA), les cristaux de cholestérol et les anticorps induisent la NETose suicidaire au bout de quelques heures. Ces stimuli activent la NADPH oxydase



entraînant la production des dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species, ROS*). Il s'ensuit la conversion des résidus arginine des histones en citrulline par l'enzyme PAD4 (*Peptidyl arginine deiminase 4*). Cette citrullination des résidus arginine ainsi que la translocation nucléaire de la MPO et de la NE contribuent à la décondensation de la chromatine. Suite à la rupture de la membrane plasmique, les filaments de chromatine associés à des protéines cytosoliques et granulaires sont relargués (Figure 11) (124).

En revanche, la liaison de *Staphylococcus Aureus* aux récepteurs du complément ou au TLR2 (*Toll-like receptor 2*), ainsi que l'interaction entre *Escherichia coli* et TLR4 induisent la NETose vitale au bout de quelques minutes. Ces stimuli activent l'enzyme PAD4 en l'absence d'un métabolisme oxydatif et favorisent l'émission des NETs via un transport vésiculaire ou le bourgeonnement de l'enveloppe nucléaire (125).

Les neutrophiles expriment également des PRRs de l'inflammasome, tels que NLRC4 (*NLR family CARD domain containing 4*), NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*) et AIM2 (*Absent in melanoma 2*). L'exposition des neutrophiles à *Salmonella Typhimurium*, au double brin d'ADN et à l'ATP (*Adenosine Triphosphate*), qui sont les agonistes respectifs de NLRC4, d'AIM2 et de NLRP3, stimule la voie canonique de l'inflammasome. Il en résulte l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  sans pyroptose concomitante. La pyroptose est une forme de mort cellulaire programmée, caractérisée par une rupture rapide de la membrane plasmique et le relargage de substances pro-inflammatoires. Par contre, la voie non canonique de l'inflammasome est caractérisée par l'activation de la caspase-11 par les bactéries Gram négatif. Il s'ensuit le clivage de la gasdermine D (GSDMD), induisant la NETose et la pyroptose des neutrophiles (126). En outre, les neutrophiles contribuent à la régulation du système immunitaire adaptatif en acquérant les caractéristiques des cellules présentatrices d'antigène. En effet, l'interaction entre les cellules dendritiques et les cellules T entraîne la sécrétion de cytokines, telles que l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), qui favorise l'expression de CMHII et des molécules co-stimulatrices par les neutrophiles (127). D'autre part, il a été démontré que les neutrophiles capturent l'antigène au niveau périphérique et migrent vers les ganglions lymphatiques d'une manière dépendante de CCR7 (*CC-chemokine receptor 7*), pour inhiber l'activité des lymphocytes B et T CD4<sup>+</sup> sans altérer celle des T CD8<sup>+</sup> (128).



**Figure 11 : Mécanismes moléculaires régulant la NETose.** La génération des NETs peut être induite par des microorganismes ou des stimuli endogènes. La liaison des virus, des champignons, des bactéries, des plaquettes et des complexes immuns à leurs récepteurs correspondants, stimule la NETose via différentes voies de signalisation. Suite à la formation des dérivés réactifs de l’oxygène (ROS), la myéloperoxydase (MPO) active la neutrophile élastase (NE). Cette dernière dégrade les filaments d’actine au niveau cytoplasmique pour bloquer la phagocytose et est ensuite transloquée au noyau afin de cliver les histones. L’enzyme PAD4 contribue également à la décondensation de la chromatine en citrullinant les histones. L’autophagie semble être aussi impliquée dans la NETose. En revanche, la dectine 1 et les serpines bloquent la NETose en séquestrant la NE au sein du phagosome et en inhibant son activité, respectivement. D’autre part, Siglec-5 et Siglec-9 empêchent la NETose en limitant l’activation des neutrophiles, ainsi que la formation des ROS. ATG7, autophagy-related protein 7; AZU, azurophilic granule; CG, cathepsin G; CR3, complement receptor 3; HMGB1, high mobility group protein B; IRAK, IL-1 receptor-associated kinase; MEK, MAPK/ERK kinase; mTOR, mechanistic target of rapamycin; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand 1; RAGE, receptor for advanced glycation end products; RIPK1, receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1; TLR, Toll-like receptor. Figure adaptée de Papayannopoulos et al. *Nature Reviews Immunology* **2018** (98).

#### IV.1.1.2. Neutrophiles dans la MVTE

En utilisant le modèle de sténose murin décrit plus haut, l'équipe de Steffen Massberg a démontré que les leucocytes sont recrutés dans un délai d'une heure vers le site de thrombose et recouvrent la surface endothéliale au bout de six heures. L'accumulation leucocytaire dépend de la P-sélectine endothéliale et non pas plaquettaire. En effet, les souris déficientes en P-sélectine (SELP<sup>-/-</sup>) et recevant des plaquettes contrôles, présentent toujours une diminution de l'adhésion leucocytaire ainsi qu'une réduction de la taille du thrombus par rapport aux souris contrôles. De plus, cette équipe a montré que les neutrophiles représentent 70 % des leucocytes recrutés et contribuent à la propagation de la thrombose veineuse en relargant les NETs (Figure 12). Ces filaments d'ADN chargés négativement, activent la voie intrinsèque de coagulation en liant le FXII. Ainsi, la neutropénie, la déficience en FXII et la dégradation des NETs via l'ADNase, confèrent une protection vis-à-vis de l'exacerbation de la MVTE (40).

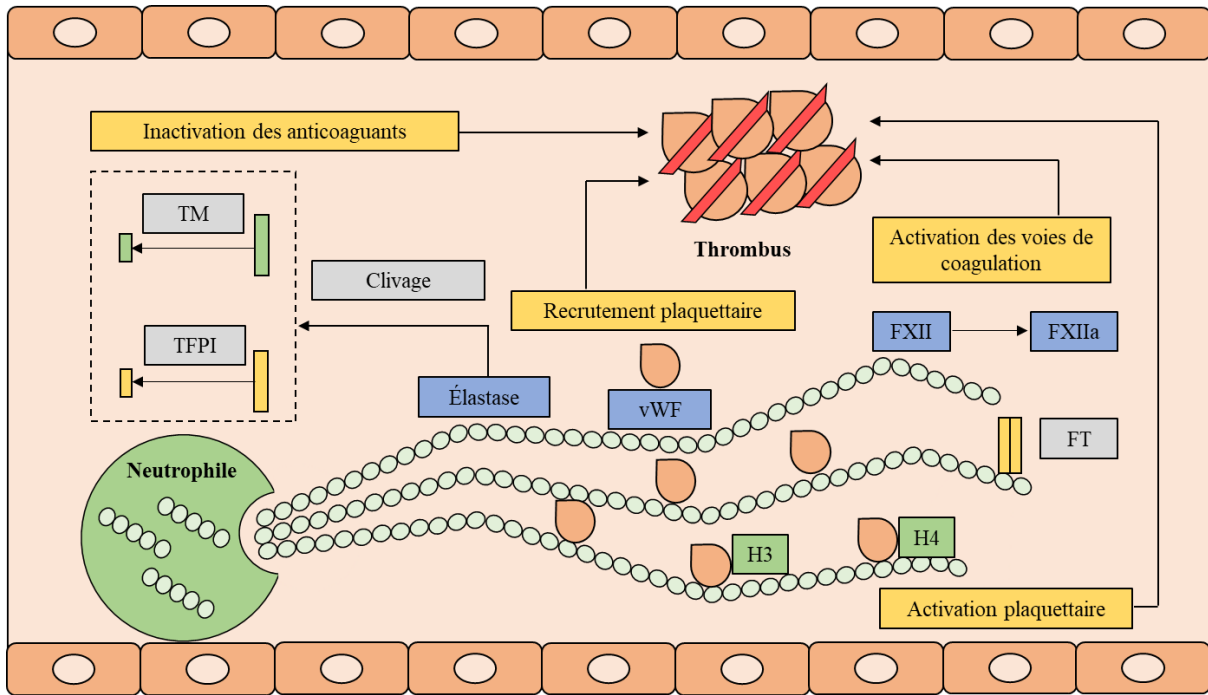
D'autre part, l'équipe de Denisa Wagner a révélé que les NETs favorisent l'adhésion plaquettaire, induisant la formation d'un thrombus au niveau de la veine iliaque des babouins. Cette interaction avec les plaquettes est médiée par le vWF, le fibrinogène et la fibronectine associés aux NETs (129). Une étude récente a mis en évidence une nouvelle coopération entre les NETs et les plaquettes, où les NETs activent l'inflammasome plaquettaire. De plus, l'inhibition pharmacologique de la caspase-1 plaquettaire *in vivo*, réduit la taille du thrombus en diminuant la NETose (130). Cependant, une autre étude a précisé que l'inflammasome des neutrophiles participe à la régulation de la NETose. Münzer et al. ont indiqué que l'enzyme PAD4 nucléaire intervient dans la décondensation de la chromatine, alors que celle cytoplasmique permet l'assemblage de l'inflammasome NLRP3/ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). Il en résulte l'activation de la caspase-1 et la génération du fragment N-terminal de la GSDMD conduisant à la NETose, suite à la perméabilisation nucléaire et la rupture de la membrane plasmique. En utilisant le modèle de sténose, les auteurs ont constaté une réduction de la NETose et de la taille du thrombus chez les souris déficientes en NLRP3 (NLRP3<sup>-/-</sup>) par rapport aux souris contrôles. Ces résultats confirment le rôle clé de l'inflammasome NLRP3 exprimé par les neutrophiles dans la NETose (131).

Chez l'homme, l'enzyme PAD4 et l'élastase des neutrophiles jouent un rôle crucial dans la formation des NETs. Martinod et al. ont constaté que seulement 10% des souris déficientes en PAD4 (PAD4<sup>-/-</sup>) développent un thrombus par rapport à 90% pour les souris contrôles, en utilisant le modèle de sténose. En outre, l'administration de neutrophiles contrôles aux souris PAD4<sup>-/-</sup> restaure le phénotype prothrombotique, soulignant un rôle essentiel de l'enzyme PAD4

exprimée par les neutrophiles dans la MVTE. Ce déficit en PAD4 réduit la NETose sans altérer le recrutement des neutrophiles, l'activation endothéliale et l'agrégation plaquettaire (132). En revanche, la déficience en élastase n'affecte pas la formation des NETs, ni la taille du thrombus *in vivo*. Cependant, cette enzyme joue un rôle crucial dans la NETose chez l'homme. Ces résultats suggèrent la présence de mécanismes de NETose différents entre les neutrophiles murins et humains. Ces effets peuvent également être dû à une compensation de l'activité de la neutrophile élastase murine par d'autres protéases, telles que la cathepsine G et la protéinase 3 (133).

En plus de la NETose, la PAD4 exerce un effet prothrombotique en inhibant l'activité de l'enzyme ADAMTS13. Cette dernière est une protéase plasmatique qui clive les multimères de vWF afin d'atténuer leur pouvoir adhésif. Sorvillo et al. ont démontré que suite à une lésion vasculaire, l'administration de la PAD4 recombinante humaine aux souris accélère l'occlusion vasculaire en augmentant la formation des complexes vWF-plaquette (134). D'autre part, la protéine transmembranaire ubiquitaire, Slc44a2, a été identifiée comme un récepteur du vWF. L'expression de l'épitope HNA-3b (*human neutrophil antigen 3b*) par la protéine Slc44a2 réduit le risque de thrombose de 30% chez l'homme. Par contre, l'épitope Slc44a2/HNA-3a contribue à l'adhésion des neutrophiles au vWF ainsi qu'à leur activation en conditions inflammatoires et en présence de forces de cisaillement. Suite à la dégranulation endothéliale *in vivo*, l'absence de Slc44a2 a été associée à une diminution du recrutement des neutrophiles (135). Outre la protéine Slc44a2, le médiateur RvD4 (*Resolvin D4*) module l'infiltration des neutrophiles. En effet, l'administration de RvD4 aux souris ayant subi la thrombose, réduit la taille du thrombus en limitant le recrutement des neutrophiles et la NETose, ainsi qu'en augmentant l'accumulation des monocytes (136).

Des études cliniques ont également mis en évidence la participation des NETs dans la TVP. Par exemple, Montfoort et al. ont constaté une augmentation des nucléosomes circulants et des marqueurs d'activation des neutrophiles (élastase- $\alpha$ 1-antitrypsine et MPO), chez les patients avec TVP par rapport aux sujets témoins (137). De plus, Diaz et al. ont montré que le taux plasmatique d'ADN circulants présente une corrélation positive avec le vWF et négative avec l'enzyme ADAMTS13, soulignant une interaction entre les NETs et le vWF dans la TVP (138) (139).



**Figure 12 : Fonctions des NETs dans la thrombose veineuse profonde.** Les NETs induisent la thrombose veineuse par plusieurs mécanismes. Ces filaments d'ADN favorisent le recrutement des plaquettes via le vWF et leur activation par le biais des histones. De même, les NETs stimulent les voies intrinsèque et extrinsèque de coagulation en liant le FXII et le facteur tissulaire, respectivement. Finalement, l'élastase associée aux NETs clive et inactive les anticoagulants naturels, le TFPI et la TM. Figure adaptée d'Engelmann et al. *Nature Reviews Immunology* **2013** (66).

## IV.1.2. Monocytes et macrophages

### IV.1.2.1. Généralités sur les monocytes et les macrophages

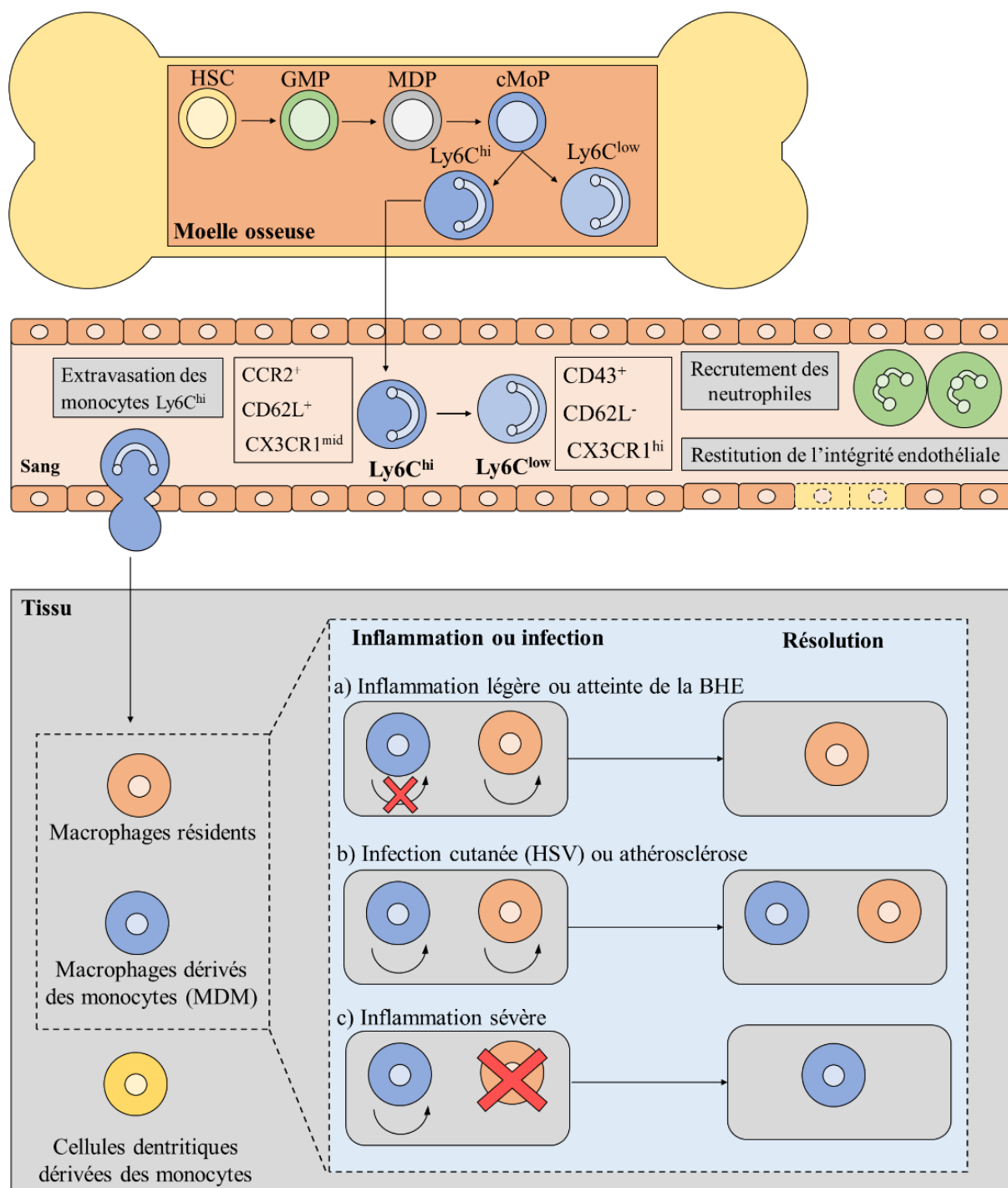
Les monocytes sont des cellules hématopoïétiques circulantes qui représentent 4% et 10% des cellules sanguines chez la souris et l'homme, respectivement (140). Chez la souris, le développement médullaire des monocytes dépend de CSF1 (*colony-stimulating factor 1*). La monocytopenie sévère peut donc résulter d'un déficit en ce facteur de croissance ou en son récepteur CSF1R (141). Les monocytes sont générés au niveau de la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques via deux précurseurs : MDP (*macrophage and dendritic cell precursor*) et cMoP (*common monocyte progenitor*) (Figure 13) (142).

Les monocytes sont généralement répartis en deux sous-populations en fonction de leurs marqueurs de surface et de leurs fonctions. Chez la souris, les monocytes inflammatoires ou Ly6C<sup>high</sup> sont caractérisés par une forte expression de Ly6C (*Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1*) et de CCR2 (*C-C chemokine receptor type 2*), mais par une faible expression de CX3CR1 (*CX3C chemokine receptor 1*). La mobilisation des monocytes Ly6C<sup>high</sup> de la moelle osseuse est régulée par le gène circadien *Bmal1* (*Brain and muscle Arnt-like protein-1*) (143). Ces monocytes ont une demi-vie de 20 heures dans la circulation sanguine et sont ensuite recrutés au niveau du site inflammatoire pour se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques (144). En revanche, les monocytes Ly6C<sup>low</sup> présentent une faible expression de Ly6C et de CCR2, mais une forte expression de CX3CR1. Ces monocytes contrôlent l'intégrité vasculaire en patrouillant le long de l'endothélium. En effet, les monocytes Ly6C<sup>low</sup> détectent les signaux de danger via TLR7 (*Toll-like receptor 7*) et induisent le recrutement des neutrophiles (145) (146). Les cellules CD14<sup>+</sup> et CD14<sup>low</sup> CD16<sup>-</sup> correspondent aux homologues humains respectifs des monocytes Ly6C<sup>high</sup> et Ly6C<sup>low</sup>. Les monocytes CD14<sup>+</sup> sont subdivisés en CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> et CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup>, qui diffèrent par leurs capacités à sécréter des cytokines inflammatoires (144).

Les macrophages résidents sont des cellules d'origine embryonnaire, découvertes au XIX<sup>ème</sup> siècle par Élie Metchnikoff (147). En fonction du tissu dans lequel ils résident, les macrophages présentent des fonctions bien spécifiques. Par exemple, les macrophages alvéolaires, les cellules de Kupffer ou macrophages hépatiques, et les ostéoclastes sont impliqués dans l'élimination des particules inhalées, la neutralisation des toxines et la résorption osseuse, respectivement (148). Suite à la détection des PAMPs par les PRRs, il a été démontré que les macrophages résidents phagocytent les agents pathogènes. Ces macrophages participent ainsi à l'immunité

innée en dégradant les microorganismes ou à l'immunité adaptative en présentant les antigènes aux lymphocytes T (149).

Les macrophages expriment à leur surface de nombreux récepteurs reconnaissant plusieurs médiateurs biochimiques. En fonction de la nature des stimuli, ces cellules dotées d'une plasticité fonctionnelle, subissent un processus de maturation et acquièrent un phénotype bien précis. L'hétérogénéité des macrophages a été initialement décrite par le paradigme de polarisation M1-M2, où M1 et M2 correspondent aux phénotypes extrêmes d'un *continuum* d'états d'activation. Selon ce modèle, M1 et M2 représentent les phénotypes pro-inflammatoire ou « classiquement activé » et anti-inflammatoire ou « alternativement activé », respectivement. L'IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  (*Tumour necrosis factor alpha*) favorisent la polarisation des macrophages vers le phénotype de type M1. Ce dernier est caractérisé par l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), la production de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que la formation d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. En revanche, le phénotype de type M2 induit par l'IL-4 (*interleukin-4*) et l'IL-13, joue un rôle important dans la prolifération cellulaire et la régénération tissulaire. D'autre part, les macrophages régulateurs M<sub>reg</sub> produisant l'IL-10, contribuent à la répression de l'inflammation ainsi qu'à l'inhibition des activités antimicrobiennes et antitumorales (150).



**Figure 13 : Dynamique des monocytes et des macrophages.** Au niveau de la moelle osseuse, les monocytes Ly6C<sup>low</sup> et Ly6C<sup>high</sup> sont produits à partir de cellules souches hématopoïétiques et sont ensuite mobilisés vers la circulation sanguine. Les monocytes Ly6C<sup>low</sup> préservent l'intégrité vasculaire en patrouillant le long de l'endothélium, alors que les monocytes Ly6C<sup>high</sup> sont recrutés vers le tissu inflammatoire, où ils se différencient en macrophages et en cellules dendritiques. La contribution des macrophages dérivés des monocytes à la réponse inflammatoire est conditionnée par le degré d'atteinte des macrophages résidents. Plusieurs scénarios sont envisageables : a) Au cours d'une inflammation légère, les macrophages résidents sont faiblement affectés et peu de monocytes sont recrutés. Par suite, la repopulation des macrophages dépend des cellules résidentes. b) Dans le cas d'une infection cutanée ou de l'athérosclérose, la repopulation des macrophages repose sur les cellules résidentes et celles



dérivées des monocytes. c) Lors d'une inflammation sévère, les macrophages résidents sont largement endommagés et la repopulation est donc basée sur les cellules dérivées des monocytes. HSC, haematopoietic stem cell; GMP, granulocyte–macrophage progenitor; MDP, macrophage and dendritic cell precursor; cMoP, common monocyte progenitor. Figure adaptée de Ginhoux et al. *Nature Reviews Immunology* 2014 (140).

#### IV.1.2.2. Monocytes et macrophages dans la MVTE

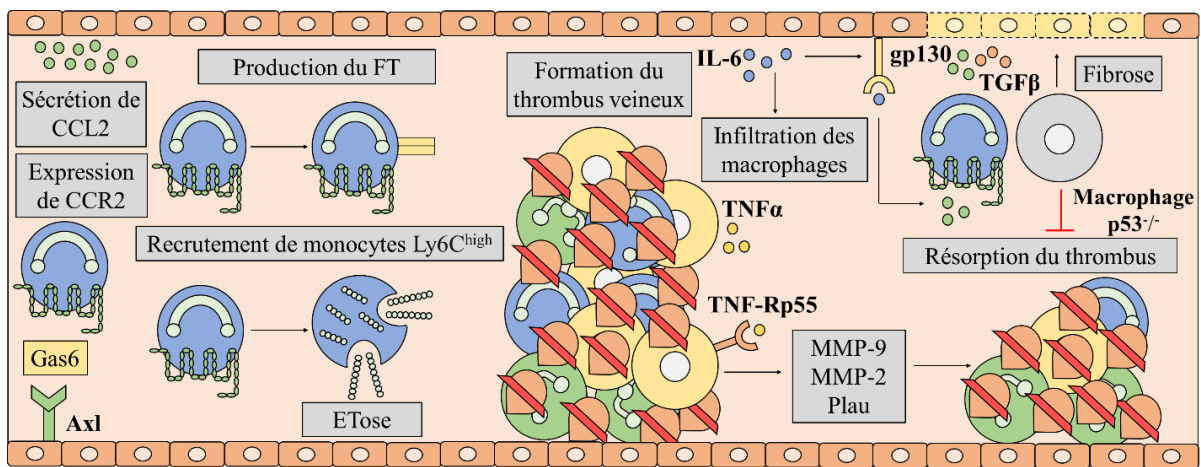
Les monocytes contribuent à la MVTE par plusieurs mécanismes (Figure 14). Ces cellules immunitaires activent les voies extrinsèque et intrinsèque de coagulation en exprimant le facteur tissulaire (FT) et en relargant des filaments d'ADN par le phénomène d'ETose. Afin de démontrer l'importance du FT exprimé par les monocytes dans la MVTE, l'équipe de Steffen Massberg a induit la thrombose veineuse à des souris déficientes en FT au niveau du compartiment myéloïde ( $LysM^{Cre}-TF^{flox/flox}$ ), en utilisant le modèle de sténose. Les auteurs ont constaté une réduction de la taille du thrombus chez ces souris par rapport aux souris contrôles, suggérant l'importance des monocytes exprimant le FT dans la MVTE. D'autre part, la transplantation de cellules médullaires exprimant une faible quantité de FT à des souris présentant une quantité normale de FT humain (HCV), n'entraîne pas la formation de thrombus. Ainsi, ces résultats soulignent le rôle crucial du FT d'origine monocyttaire et non pas endothéliale dans la thrombose veineuse (40). Par ailleurs, Granger et al. ont remarqué que les ADN extracellulaires appelés ETs « Extracellular traps » expulsés par les monocytes humains, présentent une analogie structurale avec les NETs et sont associés à la myéloperoxydase, la lactoferrine, l'élastase ainsi qu'aux histones citrullinées. Contrairement à la NETose, l'ETose génère des filaments d'ADN procoagulants via l'explosion oxydative (151).

Pour confirmer l'importance des monocytes dans la MVTE, Laurance et al. ont induit la thrombose veineuse à des souris contrôles ou déplétées en monocytes suite à l'injection de liposomes de clodronate. Les auteurs ont observé une réduction de la taille du thrombus en l'absence de monocytes, indiquant un rôle fondamental de ces cellules dans la thrombogenèse (152). En revanche, Kimball et al. ont révélé que la déplétion des monocytes avec la toxine diphtérique n'altère pas la taille du thrombus. Cette différence peut être expliquée par le fait que les liposomes de clodronate et la toxine diphtérique provoquent des déplétions totale et partielle (80%) des monocytes, respectivement (153). Laurance et al. ont également montré que la molécule Gas6 (*growth arrest–specific 6*) favorise le recrutement des monocytes inflammatoires ( $CCR2^{hi}CX3CR1^{lo}$ ) en augmentant l'expression de CCR2 par les monocytes et la sécrétion de CCL2 (*C-C motif chemokine ligand 2*) par les cellules endothéliales. Par

conséquent, les souris déficientes en Gas6 (Gas6<sup>-/-</sup>) présentent une réduction de la migration des monocytes inflammatoires et une diminution de la taille du thrombus (152). De même, l'équipe de Christian Becker a étudié le rôle des monocytes inflammatoires dans la MVTE en utilisant le modèle de sténose. Cette équipe a constaté une réduction des monocytes inflammatoires et de la taille du thrombus chez les souris déficientes en CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup>). Pour vérifier ces résultats, les auteurs ont converti les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> en Ly6C<sup>low</sup> en administrant l'agoniste de NR4A1 (*nuclear receptor group 4 family A member 1, Nur77*), la cytosporone, avant l'induction de la MVTE. Cette différenciation monocyttaire s'accompagne d'une diminution de l'incidence de thrombose. De plus, le traitement des souris avec la cytosporone après la sténose, réduit la taille du thrombus et accélère sa résorption. Cependant, le transfert des monocytes Ly6C<sup>hi</sup> exprimant le FT aux souris CCR2<sup>-/-</sup> restaure le phénotype thrombotique, corroborant l'importance des monocytes inflammatoires produisant le FT dans la MVTE (154).

D'autre part, Zhang et al. ont suggéré l'importance de la pyroptose des monocytes et des macrophages dans la MVTE en observant une diminution de la taille du thrombus chez les souris déficientes en GSDMD (GSDMD<sup>-/-</sup>) par rapport aux souris contrôles. Néanmoins, cette équipe a utilisé des souris totalement déficientes en GSDMD et non pas spécifiquement au niveau des monocytes et des macrophages. Par conséquent, leurs résultats révèlent l'importance de la pyroptose dans la MVTE sans toutefois préciser son origine cellulaire (155). Nosaka et al. ont identifié un rôle antithrombotique de l'axe TNF- $\alpha$  / TNF-Rp55 (*tumor necrosis factor receptor p55*) dans la thrombose veineuse profonde. Les auteurs ont montré que l'induction de la thrombose à des souris contrôles, s'accompagne d'une augmentation de l'expression de TNF- $\alpha$  et de TNF-Rp55 par les macrophages. D'autre part, la déficience en TNF-Rp55 *in vivo* réprime l'expression intrathrombotique de PLAU (*urokinase-type plasminogen activator*), de MMP-2 (*matrix metalloproteinase-2*) et de MMP-9 (*matrix metalloproteinase-9*), confirmant le rôle thrombolytique de TNF-Rp55. Afin de déterminer le rôle de TNF-Rp55 exprimé par les macrophages, Nosaka et al. ont traité *in vitro* des macrophages issus des souris contrôles et TNF-Rp55<sup>-/-</sup> avec du TNF- $\alpha$ . Ils ont remarqué une augmentation d'expression de MMP-2, de MMP-9 et de PLAU au niveau des macrophages contrôles, suggérant l'importance des macrophages exprimant le TNF-Rp55 dans la résorption du thrombus (156). Cette équipe a également détecté la présence d'IL-6 au niveau des macrophages intrathrombotiques. Les auteurs ont constaté un retard de la résorption du thrombus chez les souris déficientes en IL-6 (IL-6<sup>-/-</sup>) par rapport aux souris contrôles. L'absence d'IL-6 diminue l'infiltration intrathrombotique des macrophages en atténuant l'expression de CCL2. De surcroît, le déficit

en IL-6 altère les activités collagénolytiques et fibrinolytiques des macrophages en réduisant l'expression des enzymes protéolytiques MMP-2, MMP-9 et PLAU. Ainsi, l'administration d'IL-6 recombinante rétablit l'expression de ces enzymes et accélère la résorption du thrombus chez les souris IL6<sup>-/-</sup> (157). Contrairement à son rôle antithrombotique, Wojcik et al ont montré un effet profibrotique d'IL-6. En effet, la neutralisation d'IL-6 a diminué la production de CCL2, le recrutement des monocytes et la fibrose vasculaire (28). D'un autre côté, la protéine p53 module les fonctions des macrophages dans la MVTE en régulant leur polarisation. Mukhopadhyay et al. ont induit la thrombose veineuse à des souris contrôles ou déficientes en p53 au niveau du compartiment myéloïde (Tp53<sup>fl/fl</sup> LysM<sup>Cre+/+</sup>), en utilisant le modèle de stase. La déficience myéloïde en p53 (Tp53<sup>fl/fl</sup> LysM<sup>Cre+/+</sup>) est associée à la suppression du phénotype M2 et de l'activité collagénolytique, entraînant un retard de la résorption du thrombus et la fibrose vasculaire. À l'inverse, l'administration de l'agoniste pharmacologique de p53, la quinacrine, active le phénotype M2 qui contribue au remodelage vasculaire et à la résorption du thrombus (158).



**Figure 14 : Rôles des monocytes et des macrophages dans la thrombose veineuse profonde.** Au cours de la thrombogenèse, le complexe Gas6/Axl stimule l'expression de CCR2 et la sécrétion de CCL2 par les monocytes et les cellules endothéliales, respectivement. Il s'ensuit le recrutement des monocytes Ly6C<sup>high</sup> qui favorisent la formation du thrombus veineux via la production du facteur tissulaire et la libération des filaments d'ADN procoagulants. D'autre part, l'axe TNF- $\alpha$ /TNF-Rp55 des macrophages entraîne la résorption du thrombus en augmentant l'expression des métalloprotéinases et de l'activateur du plasminogène. Cependant, l'IL-6 sécrétée par les cellules endothéliales présente un rôle paradoxal. Cette cytokine facilite la thrombolyse en activant l'infiltration des macrophages et contribue à la chronicité de la thrombose veineuse en induisant la fibrose vasculaire. En effet, la liaison d'IL-6 à la glycoprotéine 130 (gp130) conduit au recrutement des monocytes produisant des facteurs profibrotiques, tels que CCL2 et TGF $\beta$  (*transforming growth factor beta*). Quant à la déficience myéloïde en p53, elle retarde la résorption du thrombus et active la fibrose vasculaire.

### **IV.1.3. Mastocytes**

#### **IV.1.3.1. Généralités sur les mastocytes**

Les mastocytes sont des cellules hématopoïétiques provenant de progéniteurs myéloïdes pluripotents. Ces précurseurs quittent la moelle osseuse et se dirigent vers les tissus, où ils se différencient en mastocytes matures sous l'influence des facteurs de croissance locaux, en particulier le SCF (*Stem cell factor*) et l'IL-3 (159). Les mastocytes font partie de la première ligne de défense immunitaire et sont principalement localisés dans les tissus vascularisés, tels que les muqueuses et les épithéliums (160). En réponse à des stimuli externes comme les neuropeptides et certaines toxines, ces cellules immunitaires libèrent leur contenu granulaire dans le milieu extracellulaire (161). Outre la dégranulation, l'activation des mastocytes peut être associée à la sécrétion de cytokines (162).

Des études ont révélé l'implication délétère des mastocytes dans les réactions allergiques, l'athérosclérose, la dermatite de contact, le cancer et l'arthrite. Cependant, ces cellules présentent des effets bénéfiques dans les infections bactériennes et la tolérance aux allogreffes (161). La majorité des effets physiologiques et physiopathologiques des mastocytes sont médiés par les granules cytoplasmiques comprenant entre autres des enzymes lysosomales, des facteurs de croissance et des protéases (163). La reconnaissance des PAMPs par les récepteurs membranaires des mastocytes conditionne la nature du contenu granulaire libéré. Par exemple, l'activation du TLR2 par les bactéries Gram positives et les mycobactéries induit la sécrétion d'IL-4. D'autre part, la liaison des lipopolysaccharides des bactéries Gram négatives au récepteur TLR4 stimule la libération des cytokines pro-inflammatoires, alors que la détection du peptidoglycane par TLR2 favorise la dégranulation mastocytaire. Ces médiateurs inflammatoires augmentent la perméabilité vasculaire et contribuent au recrutement des éosinophiles, des cellules NK et des neutrophiles (160). En plus de leur rôle dans l'immunité innée, les mastocytes participent au système immunitaire adaptatif. En effet, les mastocytes expriment les complexes majeurs d'histocompatibilité ou activent les cellules dendritiques agissant comme cellules présentatrices d'antigènes (164). De plus, il a été démontré que le TNF- $\alpha$  sécrété par les mastocytes stimule directement les cellules T cytotoxiques ou indirectement via la mobilisation des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes (165).

#### IV.1.3.2. Mastocytes dans la MVTE

Les granules mastocytaires contiennent des anticoagulants, tels que l'héparine et l'activateur tissulaire du plasminogène, ainsi que des médiateurs pro-inflammatoires comme l'histamine et le TNF- $\alpha$  (166). Afin d'étudier le rôle des mastocytes dans la MVTE, Ponomaryov et al. ont induit la thrombose veineuse chez deux souches de souris déficientes en mastocytes, Kit<sup>W-sh</sup> et Kit<sup>W-v</sup>, en utilisant le modèle de sténose (111). Ces dernières présentent des mutations au niveau du récepteur du facteur de croissance SFC, appelé KIT ou SFCR (167). Après 24h et 48h de sténose, 75% et 90% des souris contrôles développent une thrombose, alors que les souris Kit<sup>W-sh</sup> ne forment pas de thrombus. De même, aucun thrombus n'est observé chez les souris Kit<sup>W-v</sup> à comparer avec une incidence de thrombose de 89% chez les souris contrôles après 48h de sténose. En revanche, aucune différence n'est détectée entre les souris Kit<sup>W-sh</sup> et contrôles, en utilisant le modèle de chlorure de fer qui altère l'endothélium. Ces résultats suggèrent que l'effet prothrombotique des mastocytes nécessite l'intégrité de la paroi endothéliale.

Les mutations de KIT sont responsables non seulement de la déficience en mastocytes, mais aussi d'autres anomalies, telles que l'anémie macrocytaire, la mélanogenèse défectueuse et le défaut de développement des cellules germinales. Pour confirmer que l'effet prothrombotique est médié par les mastocytes et non pas par d'autres mécanismes, les auteurs ont transféré des mastocytes médullaires différenciés *in vitro* aux souris Kit<sup>W-sh</sup> et leur ont induit la thrombose 8 à 10 semaines après. Suite à la restauration du contenu mastocytaire, 67% des souris Kit<sup>W-sh</sup> forment un thrombus. L'incidence de thrombose obtenue étant similaire à celle des souris contrôles et supérieure à celle des souris Kit<sup>W-sh</sup> sans transfert mastocytaire, ce résultat souligne le rôle prothrombotique des mastocytes. Pour quantifier ces cellules au niveau de la paroi vasculaire, Ponomaryov et al. ont utilisé un marqueur des granules mastocytaires, le bleu de toluidine. Ils ont remarqué une réduction du nombre de mastocytes après l'induction de thrombose chez les souris contrôles, suggérant une migration de ces cellules hors de la paroi vasculaire ou leur dégranulation. Comme le nombre de mastocytes n'est pas affecté chez les souris n'ayant pas formé de thrombus après l'induction de thrombose, cette dernière semble donc être associée à une dégranulation mastocytaire.

Outre les mutations génétiques, les mastocytes ont été ciblés pharmacologiquement. En effet, les auteurs ont induit l'exocytose des granules par application topique du sécrétagogue mastocytaire 48/80 et ont constaté une augmentation de l'incidence de thrombose. En revanche, l'administration chronique du composé 48/80 présente un effet antithrombotique, en raison de

l'épuisement du contenu granulaire et la répression du facteur VII de la cascade de coagulation. Un effet analogue est obtenu avec les stabilisateurs membranaires, le cromoglycate de sodium et le kétotifène, qui limitent la dégranulation. Ces résultats confirment le rôle crucial des granules mastocytaires dans la MVTE. Toutefois, les auteurs suggèrent que les protéines anticoagulantes contenues dans les granules mastocytaires ne contrecarrent pas l'effet prothrombotique des médiateurs pro-inflammatoires, en raison de leur libération abluminale et l'absence d'interaction avec les facteurs de coagulation.

Pour déterminer les mécanismes prothrombotiques, l'adhésion plaquettaire et le taux plasmatique de vWF ont été évalués chez les souris Kit<sup>W-sh</sup>. L'absence de mastocytes est associée à une réduction de la libération de vWF et du recrutement plaquettaire, indiquant l'importance de ces cellules immunitaires dans l'activation endothéliale. D'autre part, l'application topique d'histamine restaure la thrombose chez les souris déficientes en mastocytes, soulignant l'importance de ce médiateur dans la MVTE. Cependant, les antagonistes des récepteurs histaminiques H1, le maléate de pyrillamine et la cétirizine, n'ont pas inhibé la thrombose in vivo. L'inefficacité de ces antihistaminiques peut être expliquée de différentes façons. Premièrement, l'effet prothrombotique des mastocytes nécessite l'action combinée de l'histamine et d'autres composants, tels que le TNF- $\alpha$ . Deuxièmement, l'histamine pourrait se lier aux récepteurs vasculaires H2 et non pas uniquement H1. Troisièmement, l'histamine stimule les cellules endothéliales du côté basal alors que les antihistaminiques agissent au niveau luminal. Quatrièmement, ces médicaments présentent une courte demi-vie par rapport à la durée de la sténose (48h). En somme, cette étude a identifié le rôle prothrombotique des mastocytes qui activent les cellules endothéliales via la libération d'histamine.

## IV.1.4. Cellules NK

### IV.1.4.1. Généralités sur les cellules NK

Les cellules NK (*Natural killer cells*) appartiennent aux cellules lymphoïdes innées (*innate lymphoid cells, ILC*) et disposent de deux fonctions principales : la cytotoxicité et la production de cytokines (168). Les protéines granulaires, telles que les perforines et les granzymes, exercent une activité cytotoxique, alors que les cytokines comme l'IFN- $\gamma$  potentialisent les effets de l'immunité innée et adaptative (169). Les cellules NK sont formées principalement dans la moelle osseuse à partir de CLP (*common lymphoid progenitors*) et sont perpétuellement renouvelées (170). Le complexe IL15/IL-15R $\alpha$  (*IL-15 receptor alpha*) généré par les cellules présentatrices d'antigènes et certaines cellules stromales, joue un rôle fondamental dans le développement des cellules NK. En effet, ce complexe favorise le maintien des cellules NK à l'état basal et augmente leur activité cytotoxique, ainsi que leur prolifération lors d'une infection virale (171). Il a été démontré que la déficience en IL-15 ou IL-15R $\alpha$  in vivo est associée à une lymphopénie, suite à la réduction de la prolifération et de la migration des cellules NK vers les ganglions lymphatiques périphériques (172). En revanche, l'injection des complexes IL-15/IL-15R $\alpha$  entraîne une forte expansion des cellules NK et des lymphocytes T CD8 $^+$ , soulignant l'importance de cette cytokine dans la lymphopoïèse (173). Pour rejoindre la circulation sanguine et les organes périphériques, les cellules NK matures expriment fortement le récepteur au sphingosine-1 phosphate 5 (S1P5) et faiblement le récepteur CXCR4 (174). Une étude a montré que la déficience en S1P5 in vivo induit la rétention des cellules NK dans la moelle osseuse, alors que l'inhibition de CXCR4 facilite leur mobilisation, confirmant le rôle opposé de ces récepteurs dans l'export des cellules NK (175).

Les cellules NK périphériques sont assez hétérogènes, à la fois phénotypiquement, fonctionnellement et anatomiquement. Les cellules NK murines ont été d'abord classées en deux groupes selon le niveau d'expression du marqueur CD11b ou Mac1 (*Macrophage-1 antigen*). Les cellules NK CD11b $^-$  sont localisées préférentiellement dans la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et le foie, et sont caractérisées par une capacité proliférative importante. D'autre part, les cellules NK CD11b $^+$  sont situées au niveau de la rate, la circulation sanguine et les poumons, et présentent des fonctions plus développées (176). Les cellules NK CD11b $^+$  ont été ensuite subdivisées à l'aide du marqueur CD27 en trois sous-populations : CD11b $^-$ CD27 $^+$ , CD11b $^+$ CD27 $^+$  et CD11b $^+$ CD27 $^-$  (177). Enfin, Chiossone et al. ont décrit un programme de maturation des cellules NK murines en quatre stades : CD11b $^-$ CD27 $^-$ , CD11b $^-$

CD27<sup>+</sup> (CD11b<sup>-</sup>), CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> et CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (CD27<sup>-</sup>). Les CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> et CD11b<sup>-</sup> sont reconnues comme des cellules précurseurs, alors que les CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> et CD27<sup>-</sup> correspondent aux formes effectrices (178). D'un autre côté, deux sous-types de cellules NK humaines ont été identifiés en fonction des marqueurs CD56 et CD16. Les cellules CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> possèdent une activité cytolytique en condition basale, alors que les cellules CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> sécrètent des cytokines après stimulation par des interleukines, telles que l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 (179).

#### IV.1.4.2. Cellules NK dans la MVTE

Les cellules NK sont une source majeure d'IFN- $\gamma$ . Cette cytokine, dont l'expression est régulée par le facteur de transcription T-bet, est impliquée dans la thromolyse. En effet, Nosaka et al. ont montré que l'IFN- $\gamma$  retarde la résorption du thrombus en réduisant l'expression de MMP-9 et de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (180). De plus, Luther et al. ont révélé que l'IFN- $\gamma$  produit par les cellules T mémoires effectrices, les T<sub>EM</sub>, diminue la dégradation du collagène et la recanalisation intrathrombotique (181). D'autre part, Bertin et al. ont étudié le rôle de l'IFN- $\gamma$  sécrété par les cellules NK dans la thrombogénèse. Tout d'abord, les auteurs ont induit la thrombose veineuse en utilisant le modèle de sténose, à des souris contrôles, déficientes pour l'IFN- $\gamma$  ou T-bet. Les auteurs ont constaté une réduction de la taille du thrombus en l'absence d'IFN- $\gamma$  ou de T-bet. Cette diminution de thrombogénèse résulte d'une suppression de la NETose sans altération du recrutement des neutrophiles et des monocytes. Des résultats similaires sont obtenus en inhibant pharmacologiquement l'IFN- $\gamma$ . En revanche, l'administration d'IFN- $\gamma$  recombinant aux souris IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> et T-bet<sup>-/-</sup> restaure la taille du thrombus à un niveau équivalent à celui des souris contrôles, soulignant un rôle prothrombotique de cette cytokine (113).

D'un autre côté, la déplétion des cellules NK par administration d'un anticorps anti-asialo-GM1 est associée à une atténuation du taux plasmatique d'IFN- $\gamma$  et de la taille du thrombus. Ces résultats suggèrent un effet prothrombotique des cellules NK médié par l'IFN- $\gamma$ . Cependant, l'injection d'anti-asialo-GM1 entraîne une déplétion non exclusive des cellules NK et constitue donc une limitation de l'étude. Pour identifier sélectivement le rôle des cellules NK dans la thrombose veineuse, les auteurs pourraient utiliser l'un des deux nouveaux modèles murins générés par Nour-Eldine et al. Dans le premier modèle, l'enzyme Cre recombinase est contrôlée par le promoteur du gène *Ncr1* (*natural cytotoxicity triggering receptor 1*) qui code pour le récepteur inhibiteur spécifique aux cellules NK, Nkp56. Ces souris ont été ensuite croisées avec des souris transgéniques qui expriment un fragment de la toxine diphtérique A (*diphtheria toxin*



A, *DTA*), modulé par flox-STOP-flox dans le locus *Rosa26* ( $R26^{\text{Isl-}DTA}$ ). Il en résulte l'excision du codon stop par la Cre recombinase et la mort des cellules NK suite à l'expression de *DTA*. Par contre, le second modèle présente la mutation *Noé*, qui inhibe l'expression de *NKp56* et induit l'hyperréactivité des cellules NK (182) (183).

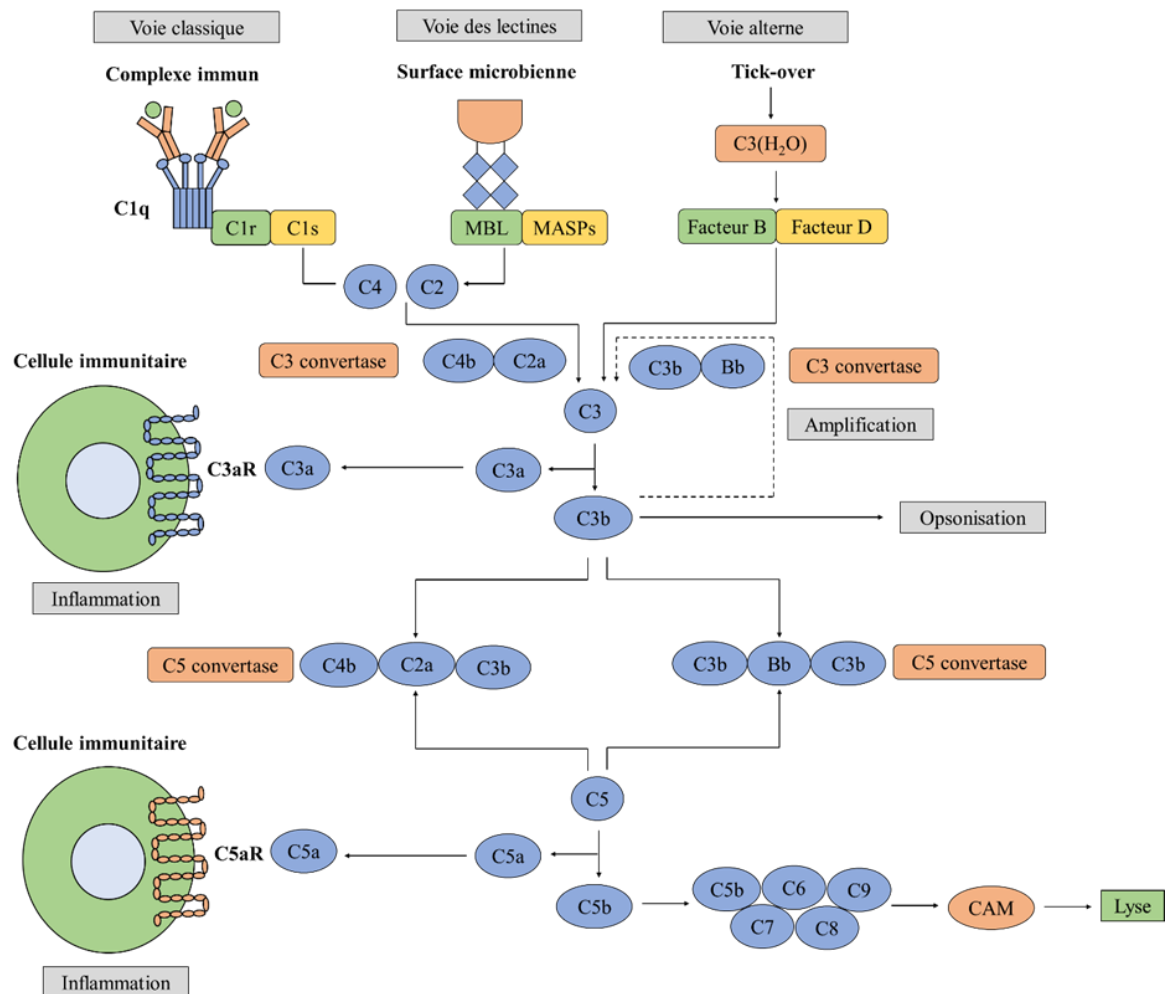
Afin de confirmer le rôle d' $\text{IFN-}\gamma$  généré par les cellules NK dans la MVTE, Bertin et al. ont transféré des cellules NK issues de souris contrôles ou  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ , à des souris déplétées en NK via l'injection d'anti-NK1.1. Ils ont remarqué que seules les cellules NK provenant de souris contrôles restituent la NETose et la taille du thrombus. De même, des études in vitro ont démontré que la co-culture des neutrophiles avec des cellules NK contrôles et non pas déficientes en  $\text{IFN-}\gamma$  augmente la NETose. Ces résultats démontrent que les cellules NK contribuent à la thrombogenèse par l'intermédiaire d' $\text{IFN-}\gamma$  (113).

## IV.1.5. Système du complément

### IV.1.5.1. Généralités sur le système du complément

Le système du complément est un effecteur de l'immunité innée, découvert à la fin des années 1890 par Jules Bordet. Il comprend plus de trente protéines plasmatiques et membranaires qui jouent un rôle clé dans l'élimination des pathogènes, l'intégrité cellulaire, l'homéostasie tissulaire et la modulation du système immunitaire adaptatif (184).

Le complément est activé séquentiellement via trois voies : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne (Figure 15). La voie classique est initiée par la fixation de C1q à la région Fc des immunoglobulines G et M, reconnaissant des antigènes spécifiques. Il en résulte l'activation des sérines protéases, C1r et C1s, induisant la formation du complexe C1 (C1qrs). Ce dernier clive les protéines C4 et C2 en (C4a-C4b) et (C2a-C2b), respectivement. Les petits fragments, C4a et C2b, sont libérés dans la circulation sanguine, alors que les grands fragments, C4b et C2a, s'assemblent pour former la C3 convertase. D'autre part, la voie des lectines est déclenchée par l'interaction entre la MBL (*Mannose Binding Lectin*) ou les ficolines et les polysaccharides bactériens. Les MASPs (*MBL-associated serine proteases*) clivent les protéines C4 et C2, générant la C3 convertase (C4b2a), identique à celle de la voie classique. Quant à la voie alterne, elle agit comme un système de surveillance en maintenant un faible niveau d'activation du système du complément par un processus connu sous le nom de « tick-over ». Ce dernier correspond à l'hydrolyse spontanée du C3 en C3(H<sub>2</sub>O), forme bio-active du C3, dans la phase fluide. C3(H<sub>2</sub>O) s'associe au facteur B, qui est ensuite clivé par le facteur D en fragments Ba et Bb. L'enzyme iC3Bb (*initiation phase C3 convertase*) clive la protéine C3 en C3a et C3b. À la surface des microorganismes, le facteur B interagissant avec C3b, est clivé par le facteur D, pour former la C3 convertase alterne (C3bBb). Les C3 convertases (C4b2a ou C3bBb) clivent la protéine C3 en C3a, une anaphylatoxine, et en C3b, un composant des C5 convertases (C4b2a3b ou C3bBb3b). Il s'ensuit le clivage de la protéine C5 en C5a, une anaphylatoxine, et en C5b, un fragment lié à la membrane cellulaire. La phase terminale du complément conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM, C5b-C9) qui est à l'origine de la lyse cellulaire (184).

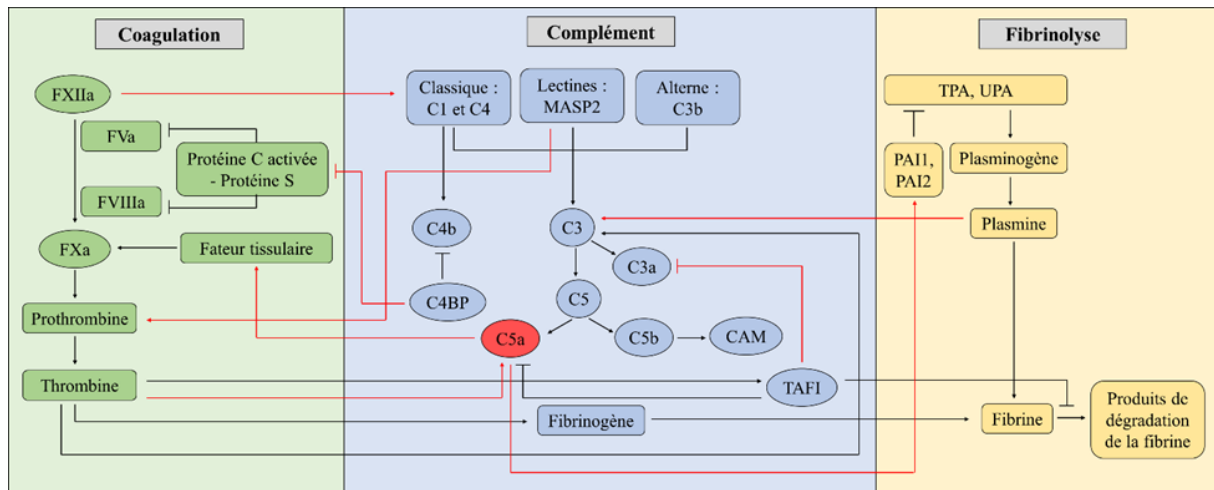


**Figure 15 : Voies du système du complément.** La voie classique est déclenchée par la liaison de C1q au complexe immun. La voie des lectines est induite par la fixation de la MBL ou des ficolines aux structures glucidiques, alors que la voie alterne est initiée spontanément. Ces trois voies convergent vers la formation des C3 convertases qui clivent C3 en l’anaphylatoxine C3a et l’opsonine C3b. Il s’ensuit l’activation des C5 convertases qui génèrent les anaphylatoxines C5a et C5b. Cette dernière s’associe aux protéines C6 à C9 pour former le complexe d’attaque membranaire (CAM). C3aR, C3a receptor; C5aR, C5a receptor. Figure adaptée d’A. Trouw et al. *Nature Reviews Rheumatology* **2017** (185).

Afin d’éviter d’endommager les tissus sains, le complément est finement régulé par des protéines sériques ou membranaires. Ces protéines dégradent les protéases impliquées dans la cascade du complément, inhibent leur activité enzymatique ou contrôlent la formation du complexe d’attaque membranaire. Les protéines solubles comportent l’inhibiteur C1, le facteur I, le C4BP (*C4b-binding protein*), le facteur H, la carboxypeptidase N, la protéine S et la clustérine. L’inhibiteur C1 inactive les sérines protéases C1r et C1s de la voie classique, ainsi que la MASP1 et la MASP2 de la voie des lectines. Le facteur I induit le clivage protéolytique de C4b et C3b, en association avec les cofacteurs respectifs C4BP et facteur H. De plus, le

C4BP et le facteur H contribuent à la destruction des C3 convertases, C4b2a et C3bBb, des voies classique et alterne, respectivement. La carboxypeptidase N réduit l'activité pro-inflammatoire des anaphylatoxines C3a et C5a, en éliminant le résidu arginine terminal. La protéine S et la clustérine préviennent l'insertion membranaire du complexe C5b-C7 et interfèrent avec la polymérisation de C9. D'un autre côté, les protéines membranaires comprennent entre autres, le CR1 (*complement receptor 1*), la MCP (*membrane co-factor protein*) et le DAF (*decay-accelerating factor*). Le CR1, connu également sous le nom de CD35, est exprimé par les érythrocytes, les phagocytes, les lymphocytes B et certains sous-types de cellules T. Ce récepteur agit comme cofacteur du facteur I et accélère la désintégration des C3 convertases des trois voies. De même, la MCP ou CD46 est un cofacteur du facteur I, alors que le DAF ou CD55 favorise la dégradation des C3 convertases des trois voies (186).

Traditionnellement, les systèmes du complément et de la coagulation étaient décrits sous forme de cascades séparées. Cependant, ces deux systèmes issus d'une même voie ancestrale sont composés de sérine protéases présentant des caractéristiques structurales communes. Outre la similitude structurale, ces deux cascades protéolytiques interagissent sur le plan fonctionnel et forment un réseau complexe (Figure 16). Au cours d'une septicémie, des liens réciproques entre les systèmes du complément, de la coagulation et de la fibrinolyse ont été mis en évidence. En effet, le facteur XII activé (FXIIa) déclenche la voie classique du complément en clivant la protéine C1 (187). De plus, la thrombine peut agir comme une C5 convertase, générant la protéine C5a et le complexe d'attaque membranaire d'une manière indépendante de C3 (188). D'autre part, le système du complément exacerbe la coagulation en activant les plaquettes et en induisant l'expression du FT et de PAI-1 par les leucocytes (189) (190). Par conséquent, le blocage de C5a pendant la septicémie expérimentale s'accompagne d'une réduction de la coagulation intravasculaire disséminée. Par ailleurs, le système du complément amplifie indirectement la coagulation en interférant avec les mécanismes anticoagulants. Par exemple, la formation d'un complexe entre les protéines C4BP et S, diminue la disponibilité de la protéine S à agir comme cofacteur de la protéine C anticoagulante (191). De même, le système du complément pourrait indirectement affecter la coagulation via des facteurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-6, le TNF $\alpha$  et la HMGB1 (187).



**Figure 16 : Interdépendance des systèmes du complément, de la coagulation et de la fibrinolyse.** Le système du complément, la cascade de coagulation et celle de fibrinolyse communiquent à travers de nombreuses interactions directes et bidirectionnelles (indiquées par des flèches rouges). Le FXIIa stimule la voie classique du complément en clivant la protéine C1. En revanche, la thrombine, la kallikréine (non représentée) et la plasmine clivent directement la protéine C3. De plus, la thrombine contourne les trois voies du complément en clivant C5 en C5a, indépendamment de C3. Par contre, le TAFI (*Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*) bloque le système du complément en inactivant C3a et C5a par rétrocontrôle négatif. D'autre part, C5a amplifie la coagulation en induisant l'expression du FT et de PAI-1 par les leucocytes. Quant aux protéines MASP2 et C4BP, elles potentialisent la coagulation en convertissant la prothrombine en thrombine et en inhibant les protéines anticoagulantes C et S, respectivement. TPA, tissue plasminogen activator; UPA, urokinase-like plasminogen activator. Figure adaptée de Rittirsch et al. *Nature Reviews Immunology* **2008** (187).

#### IV.1.5.2. Système du complément dans la MVTE

La coopération entre les systèmes du complément et de la coagulation ne se limite pas à la septicémie. En effet, Subramaniam et al. ont étudié l'interaction entre le système du complément et la coagulation dans la thrombose veineuse profonde. Tout d'abord, l'équipe a caractérisé les liens entre le complément et l'hémostase, en évaluant les temps de saignement chez des souris déficientes en C3 (C3<sup>-/-</sup>) ou en C5 (C5<sup>-/-</sup>). Les souris C3<sup>-/-</sup> présentent une prolongation du temps jusqu'au premier arrêt du saignement, ainsi que du temps de saignement total par rapport aux souris contrôles. En revanche, les souris C5<sup>-/-</sup> ont montré uniquement une prolongation du temps de saignement total par rapport aux souris contrôles. Ces résultats suggèrent une anomalie de l'hémostase primaire chez les souris C3<sup>-/-</sup> et une diminution de la stabilité du thrombus chez les souris C5<sup>-/-</sup>. Afin de déterminer le rôle du complément dans la MVTE, les auteurs ont induit la thrombose veineuse chez les souris C3<sup>-/-</sup> et C5<sup>-/-</sup>, en utilisant le modèle de sténose. Après 48h de sténose, 30% des souris C3<sup>-/-</sup> et 80% des souris contrôles développent un thrombus. Cette réduction de l'incidence de thrombose est associée à une

diminution de la taille et du poids du thrombus. La déficience en C3 s'accompagne d'une atténuation du dépôt de fibrine et de l'adhésion plaquettaire, sans affecter le recrutement leucocytaire. D'autre part, les souris C5<sup>-/-</sup> présentent une réduction de la taille et du poids du thrombus par rapport aux souris contrôles, sans altération de l'incidence de thrombose. Subramaniam et al. ont également observé que la déficience en C5 diminue l'activité pro-coagulante du FT exprimé par les monocytes, sans interférer avec l'adhésion plaquettaire et leucocytaire. En effet, la protéine C5 active le FT en stimulant la protéine disulfure isomérase et en induisant l'exposition membranaire de la phosphatidylsérine (192) (193).

D'un autre côté, l'équipe de Pierre-Emmanuel Morange a identifié le C4BPB/C4BPA comme un locus de susceptibilité à la thrombose veineuse. La protéine C4BP, composée de chaînes alpha et bêta, existe sous trois isoformes  $\alpha_7\beta_1$ ,  $\alpha_7\beta_0$  et  $\alpha_6\beta_1$ .  $\alpha_7\beta_1$  est l'isoforme principal, alors qu' $\alpha_7\beta_0$  représente 17% des molécules de C4BP. La chaîne alpha possède plusieurs ligands, tels que les protéines C3b et C4b du complément, CD40, CRP (*C-reactive protein*) et l'héparine, tandis que la chaîne bêta est spécifique de la protéine S. En vue de détecter les facteurs génétiques influençant les taux plasmatiques de C4BP, les auteurs ont analysé 283 437 polymorphismes mononucléotidiques (*SNPs, single nucleotide polymorphisms*) dans l'étude GAIT (*Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia*). Ils ont remarqué que le SNP rs3813948 est responsable de l'augmentation du taux plasmatique de l'isoforme  $\alpha_7\beta_0$  et contribue à une amplification du risque de thrombose veineuse via un mécanisme indépendant de la protéine S, dans les études cas-témoins MARTHA (*MARseille THrombosis Association study*) et FARIVE (*FActeurs de RIisque et de récidives de la maladie thromboembolique VEineuse*) (194). En outre, Skejflo et al. ont évalué l'effet des variants génétiques et de l'inflammation chronique sur les taux plasmatiques de C5 dans l'étude Tromsø. Ils ont constaté que les taux plasmatiques de C5 ne sont pas modulés génétiquement et sont légèrement influencés par l'inflammation chronique. Cependant, ils ont observé une association entre les taux élevés de C5 et le risque de MVTE. D'autre part, Grover et al. ont examiné le rôle de l'inhibiteur de C1 dans la MVTE (195). Dans l'étude Tromsø, les taux élevés de l'inhibiteur de C1 s'accompagnent d'une réduction du risque de MVTE, de MVTE non provoquée et d'embolie pulmonaire. De plus, des expériences *in vitro* ont confirmé l'activité anticoagulante de l'inhibiteur de C1 qui bloque la génération de thrombine et prolonge le temps de thromboplastine partielle activée. De surcroît, le poids du thrombus est diminué chez des souris contrôles ayant reçu l'inhibiteur humain de C1 avant l'induction de la thrombose. Ces résultats suggèrent un effet antithrombotique de cette protéine. Finalement, des études utilisant des souris déficientes en inhibiteur de C1 ou

présentant des variants de cette protéine régulatrice sont en cours afin d'élucider les mécanismes moléculaires antithrombotiques (196).

## **IV.2. Système immunitaire adaptatif dans la MVTE**

### **IV.2.1. Lymphocytes T**

#### **IV.2.1.1. Généralités sur les lymphocytes T**

Les lymphocytes T jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Ils proviennent de précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse et se différencient dans le thymus. À ce niveau, ils acquièrent le récepteur de reconnaissance de l'antigène, TCR (*T cell receptor*), ainsi que les co-récepteurs CD4 et CD8 spécifiques des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> (197). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> reconnaissent les peptides présentés par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classes I et II, respectivement. Les cellules T CD4<sup>+</sup> se différencient en lymphocytes T auxiliaires (T<sub>H</sub>) présentant des effets pro-inflammatoires ou en lymphocytes T régulateurs (T<sub>reg</sub>) exerçant des activités anti-inflammatoires. En fonction des facteurs de transcription et des cytokines sécrétées, nous distinguons plusieurs sous-types de cellules T<sub>H</sub> : T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>9, T<sub>H</sub>17, T<sub>H</sub>22, et les cellules T auxiliaires folliculaires (T<sub>FH</sub>). En revanche, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou cytotoxiques (T<sub>C</sub>) détruisent les cellules infectées ou malignes via les interactions Fas/FasL induisant l'apoptose, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ou la libération de granules cytolytiques (198).

Les cellules T mémoires circulantes sont divisées en deux sous-types selon leurs fonctions effectrices, leurs capacités prolifératives et leurs potentiels de migration : les cellules T mémoires centrales (T<sub>CM</sub>) caractérisées par la présence de CCR7 et CD62L (L-sélectine), et les cellules T mémoires effectrices (T<sub>EM</sub>) n'exprimant pas ces molécules. Les cellules T<sub>CM</sub> produisent de l'IL-2 et sont dotées d'une capacité proliférative importante, alors que les cellules T<sub>EM</sub> sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et ont une faible capacité proliférative. Les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> sont prédominantes dans les organes lymphoïdes secondaires, tandis que les cellules T<sub>EM</sub> sont localisées dans les compartiments périphériques. En plus des cellules T mémoires circulantes, les cellules T mémoires résidentes (T<sub>RM</sub>) ont été découvertes. Ces cellules persistent au niveau des tissus périphériques après l'élimination de l'infection (199) (200) (201).

Les lymphocytes T participent aux maladies cardiovasculaires, par exemple à l'athérosclérose. Les cellules T<sub>H</sub>1 exprimant le facteur de transcription T-bet, sont prépondérantes dans la plaque athéromateuse. Ces cellules contribuent à l'athérosclérose par plusieurs mécanismes. Elles sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et du TNF $\alpha$  qui favorisent la polarisation des macrophages vers un



phénotype pro-inflammatoire, stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et contribuent à l'instabilité de la plaque athéromateuse. D'autre part, les cellules T<sub>H</sub>2 exprimant le facteur de transcription GATA3, produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. L'IL-5 et l'IL-13 sont des cytokines athéroprotectrices, alors que la fonction de l'IL-4 est inconnue. Le rôle des cellules T<sub>H</sub>17 exprimant le facteur de transcription ROR $\gamma$ t (*RAR-related orphan receptor gamma t*) est controversé dans l'athérosclérose. En effet, les cellules T<sub>H</sub>17 sécrètent de l'IL-17 qui présente simultanément des effets athéroprotecteurs et athérogènes. L'IL-17 stabilise la plaque athéromateuse en induisant la production du collagène de type I par les cellules musculaires lisses vasculaires et amplifie la réponse inflammatoire en activant la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. D'autre part, les cellules Treg exprimant le facteur de transcription FOXP3, (*forkhead box protein P3*) produisent des cytokines athéroprotectrices, telles que l'IL-10 et le TGF $\beta$ . L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire et le TGF $\beta$  assure la stabilité de la plaque athéromateuse. Quant aux cellules T CD8<sup>+</sup>, elles exacerbent l'athérosclérose en exerçant des effets cytotoxiques sur les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Par contre, les cellules CD8<sup>+</sup> Treg répriment l'athérosclérose en provoquant la lyse des cellules présentatrices d'antigène et en inhibant la polarisation des cellules T<sub>H</sub> vers des phénotypes athérogènes (202) (203) (204).

#### **IV.2.1.2. Lymphocytes T dans la MVTE**

L'équipe de Christian Becker a étudié le recrutement, l'activation et le rôle d'un sous-type de lymphocytes T dans la MVTE. Les auteurs ont induit la thrombose veineuse à des souris contrôles en utilisant le modèle de sténose. Ils ont constaté une infiltration des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> dans la paroi veineuse et le thrombus au cours de la thrombogénèse, ainsi que leur maintien tout au long de la phase de résorption. Il s'agit principalement des cellules T mémoires effectrices (T<sub>EM</sub>) caractérisées par la forte expression de CD44 et la faible expression de CD62 (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>). Pour déterminer si les antigènes sont impliqués dans l'activation des lymphocytes T, ils ont induit la thrombose veineuse à des souris transgéniques Nur77<sup>GFP</sup> exprimant la protéine fluorescente verte GFP sous le contrôle du récepteur nucléaire orphelin Nr4A1 (Nur77). L'expression de ce dernier augmente en cas de stimulation du récepteur antigénique des lymphocytes T. Après 24h de thrombose, le marqueur d'activation CD69 est augmenté sur les cellules T de la paroi veineuse sans altération de la GFP, confirmant une activation des lymphocytes T indépendante de l'antigène. De plus, ils ont observé qu'au niveau de la paroi veineuse, le nombre des cellules CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> produisant de l'IFN- $\gamma$  est plus important

que celui des cellules CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>. En vue d'identifier les signaux inflammatoires activant les lymphocytes T et induisant la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , les auteurs ont réalisé des expériences in vitro. Au niveau de la paroi veineuse, ils ont détecté une augmentation d'expression d'ARNm des cytokines et des chimiokines suivantes : IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-27, IL-33, IFN- $\beta$ , CCL3 et CCL8. Ils ont ensuite montré que ce cocktail de cytokines et de chimiokines assure une production optimale d'IFN- $\gamma$  par les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> au bout de 24h. Pour caractériser le rôle des cellules T<sub>EM</sub> dans la MVTE, ils ont évalué la réponse inflammatoire en présence et en l'absence de ces cellules. Les cellules T<sub>EM</sub> ne peuvent pas être sélectivement déplétées et leur transfert aux souris déficientes en lymphocytes T altèrent leur état fonctionnel. Pour générer des souris sélectivement déficientes en cellules T<sub>EM</sub>, les auteurs ont donc déplété tous les lymphocytes T et ont attendu la reconstitution du compartiment des cellules T naïves. La déficience en cellules T<sub>EM</sub> n'affecte pas la thrombogénèse, mais accélère la résorption du thrombus en augmentant l'expression de MMP-9 et en favorisant la néovascularisation à J14. De plus, l'absence des cellules T<sub>EM</sub> réduit l'influx des monocytes inflammatoires (Ly6C<sup>high</sup>Nur77neg), sans toutefois influencer leur transition vers un phénotype réparateur (Ly6C<sup>low</sup>Nur77<sup>+</sup>) (181). Enfin, l'effet prothrombotique des cellules T<sub>EM</sub> semble être médié par l'IFN- $\gamma$ , qui est connu pour réprimer la thromolyse en inhibant la production de MMP-9 par les monocytes. En revanche, Mukhopadhyay et al. ont révélé un effet anti-thrombotique des lymphocytes T (180). En effet, la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> via les anticorps anti-CD4 et anti-CD8, retarde la résorption du thrombus en réduisant l'infiltration des macrophages, l'expression protéique de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et l'activité gélatinolytique de MMP-9. La divergence des résultats entre les deux études suggère que la modulation de la résorption du thrombus dépend du sous-type lymphocytaire (205).

Outre les cellules T<sub>EM</sub>, l'équipe de Christian Becker a constaté une accumulation des cellules Treg au niveau de la paroi veineuse des souris en utilisant le modèle de sténose. En vue de déterminer la contribution des cellules Treg à la MVTE, Shahneh et al. ont réalisé une déplétion ou une expansion de cette population. La déplétion des cellules Treg via l'injection de la toxine diphtérique est associée à un retard de la résorption du thrombus. En effet, l'absence de Treg conduit à la réduction d'expression de l'ARNm du facteur uPA, une augmentation de celle de PAI-1, une diminution du dépôt de collagène intrathrombotique et une activation de la néovascularisation. En revanche, l'expansion des cellules Treg par l'intermédiaire des complexes IL-2/anti-IL-2 accélère la résorption du thrombus. L'altération du nombre de

cellules Treg affecte non seulement les enzymes fibrinolytiques, mais également le nombre de monocytes et l'activité des MMPs qu'ils génèrent. Ainsi, l'expansion des Treg potentialise le recrutement des monocytes et l'activité de leurs MMPs. Par microscopie intravitale, les auteurs n'ont pas observé de colocalisation entre les monocytes et les cellules Treg, suggérant une interaction indirecte entre ces cellules. En utilisant le séquençage de l'ARN de cellule unique, les auteurs ont identifié les cellules SPARC<sup>+</sup> Treg au niveau du thrombus veineux. La protéine SPARC (*secreted protein acidic and rich in cystein*) est une glycoprotéine modulant les interactions entre les cellules et leur microenvironnement. L'incubation de la paroi veineuse et du thrombus avec la protéine SPARC s'accompagne d'une augmentation de l'activité des MMPs monocytaires. De surcroît, le transfert de cellules Treg déficientes pour SPARC aux souris immunodéficientes (RAG<sup>-/-</sup>), retarde la résorption du thrombus en limitant le nombre et la différenciation des monocytes. Ces résultats démontrent l'activité anti-thrombotique de la protéine SPARC. Comme les complexes IL-2/anti-IL-2 accélère la résorption du thrombus via l'expansion des cellules Treg, les auteurs ont voulu déterminer le moment de leur administration. Ils ont remarqué que l'injection des complexes IL-2/anti-IL-2 au cours de la phase inflammatoire retarde la résorption du thrombus, en facilitant probablement l'expansion des cellules T non régulatrices. Pour identifier l'effet de ces complexes sur la récurrence, ils ont induit aux souris une deuxième thrombose après la résorption du premier thrombus. Ils ont constaté que les complexes IL-2/anti-IL-2 n'interfèrent pas avec la formation et la résorption du second thrombus, suggérant un effet thrombolytique local des cellules Treg (206).

## IV.2.2. Lymphocytes B

### IV.2.2.1. Généralités sur les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont des acteurs importants de l'immunité adaptative. Ils sont caractérisés par l'expression de récepteurs membranaires appelés BCRs (*B-cell receptors*) qui correspondent à des immunoglobulines de surface reconnaissant des antigènes (207). Au cours de la lymphopoïèse B, les pré-BCRs des cellules pré-pro B subissent différents réarrangements de leurs chaînes lourdes et légères pour générer les BCRs des lymphocytes B immatures (208) (209). Les BCRs forment des complexes avec d'autres protéines membranaires, telles que l'antigène CD19, le PTPRC (*Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C*) connu également sous le nom de B220, le récepteur CD22, ainsi que les chaînes Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  de la protéine dimérique CD79. Ces complexes régulent le développement, la différenciation et l'activation des lymphocytes B via les voies de signalisation NF- $\kappa$ B, PI3K et MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (210).

Les cellules B1 et B2 sont les deux principaux types de lymphocytes B qui se distinguent par leurs marqueurs de surface, leurs mécanismes d'activation et leurs localisations anatomiques (211). Les cellules B1 se développent à partir de cellules souches hématopoïétiques du foie fœtal et sont ensuite maintenues en périphérie par auto-renouvellement. En revanche, les cellules B2 ont une demi-vie de quelques jours et sont continuellement remplacées par des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. En réponse à un antigène, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes sécrétant des anticorps ou en cellules B mémoires. Les lymphocytes B1 sont divisés en cellules B1a exprimant le marqueur de surface CD5 et en cellules B1b. Les cellules B1a et B1b patrouillent les niches pleurales et péritonéales, alors que les cellules B2 recirculent à travers les systèmes sanguin et lymphatique vers les organes lymphoïdes secondaires (212). Les réponses humorales dirigées contre les antigènes sont classées en T-dépendantes et T-indépendantes. Les lymphocytes B1 et les cellules B de la zone marginale (ZM) produisent des anticorps naturels indépendamment de l'aide des lymphocytes T (213). Par contre, les cellules B2 folliculaires coopèrent avec les lymphocytes T pour former les centres germinatifs. À ce niveau, la maturation d'affinité et la commutation isotypique se produisent afin de générer des anticorps de forte affinité (214).

En fonction de la séquence d'acides aminés des régions constantes des chaînes lourdes, cinq classes d'immunoglobulines ont été identifiées : IgA, IgD, IgE, IgG, et IgM. Les IgG sont subdivisées en quatre sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3, et IgG4 chez l'homme et IgG1, IgG2a/c,

IgG2b, et IgG3 chez la souris (215). Les immunoglobulines présentent des différences structurales, fonctionnelles, et post-traductionnelles. Par exemple, les IgD, les IgE et les IgG sont des monomères alors que les IgM ont une structure pentamérique. De plus, les IgD sont les seules immunoglobulines qui ne sont pas sécrétées en condition physiologique (216). Outre la production d'anticorps, les lymphocytes B sont des sources de cytokines et de chimiokines. Par exemple, la sécrétion de GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) par un sous-type de lymphocytes B1a, les cellules IRA (*Innate response activator*), favorise l'activation des cellules dendritiques, tandis que la production de CCL7 coordonne la mobilisation des monocytes après l'infarctus aigu du myocarde (217) (218).

Les lymphocytes B sont également impliqués dans d'autres maladies cardiovasculaires, notamment dans l'athérosclérose. Il a été démontré que la fonction des lymphocytes B varie en fonction du sous-type cellulaire. Les lymphocytes B1a sont athéroprotecteurs, alors que les lymphocytes B2 et IRA présentent des effets athérogènes. En effet, les lymphocytes B1a sécrètent des IgM, qui neutralisent les lipoprotéines de basse densité oxydées (oxLDL) et favorisent la clairance des cellules apoptotiques. En revanche, les lymphocytes B2 produisent des IgG et des IgE, qui stimulent la réponse inflammatoire des macrophages. D'autre part, les lymphocytes IRA exacerbent l'athérosclérose en facilitant l'expansion des anticorps IgG2c dirigés contre les oxLDL (210) (204).

#### **IV.2.2.2. Lymphocytes B dans la MVTE**

La contribution des lymphocytes B à la thrombose veineuse profonde n'est pas élucidée comme dans le cas d'autres pathologies cardiovasculaires, telles que l'athérosclérose. Cependant, des résultats de Frey et al. ont montré un rôle potentiel des lymphocytes B dans la MVTE. Après avoir subi une splénectomie, des souris ont reçu une infusion intrapéritonéale de splénocytes, de splénocytes déplétés en lymphocytes B ou de lymphocytes B seuls, avant de leur induire la thrombose veineuse en utilisant le modèle de stase. Frey et al. ont constaté que le thrombus des souris splénectomisées est plus grand que celui des souris contrôles. De plus, l'infusion de splénocytes ou de lymphocytes B seuls réduit la taille du thrombus. Par contre, le thrombus n'est pas affecté par l'injection de splénocytes déplétés en lymphocytes B. Ces résultats suggèrent un rôle important des lymphocytes B provenant de la rate dans la résorption du thrombus (219). D'autre part, le transfert de lymphocytes B2 à des souris déficientes en lymphocytes B ( $\mu$ MT) ou déplétées en lymphocytes B2 via l'anticorps anti-CD20 pourraient confirmer le rôle thrombolytique des lymphocytes B.

## V. DAMPs et TLRs dans la MVTE

### V.1. DAMPs dans la MVTE

Au cours de la formation du thrombus veineux, des dommages tissulaires se produisent, induisant la libération du contenu cellulaire. Des études ont souligné l'implication de certains DAMPs dans la MVTE, tels que l'adénosine triphosphate ATP et la HMGB1. Nous détaillerons ci-dessous la contribution des DAMPs à la MVTE.

#### V.1.1. Adénosine triphosphate

Dans des conditions de stress, telles que l'inflammation et l'hypoxie, l'ATP est libéré par les cellules nécrotiques et apoptotiques du milieu intracellulaire vers le compartiment extracellulaire (220). L'ATP extracellulaire peut se fixer aux récepteurs purinergiques P2 comprenant les récepteurs ionotropes P2X et métabotropes P2Y (221). Les récepteurs P2X sont généralement composés d'homotrimères, qui lient l'ATP avec une concentration médiane efficace  $EC_{50}$  de l'ordre de 0.5 à 1  $\mu\text{M}$ , à l'exception de P2X<sub>2</sub> (10 $\mu\text{M}$ ) et de P2X<sub>7</sub> (100 $\mu\text{M}$ ). Suite à la fixation de l'ATP, ces canaux deviennent perméables aux ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . L'ATP active l'inflammasome NLRP3 via le récepteur P2X<sub>7</sub>. En effet, l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 nécessite deux signaux : le signal d'amorçage augmente la transcription des composants de l'inflammasome par l'intermédiaire de la voie de signalisation NF- $\kappa\text{B}$ , alors que le signal d'activation médié par l'axe ATP/P2X<sub>7</sub> favorise la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 (222).

Parmi les récepteurs P2Y, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> et P2Y<sub>6</sub> sont couplés aux protéines G<sub>q</sub> à action stimulatrice, alors que P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> et P2Y<sub>14</sub> sont associés aux protéines G<sub>i</sub> à action inhibitrice. Ces récepteurs stimulent entre autres les cellules immunitaires en mobilisant le calcium ou en réduisant l'accumulation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) anti-inflammatoire (223). En plus de l'activation des récepteurs purinergiques, l'ATP constitue le précurseur métabolique de l'adénosine extracellulaire. Les ectonucléotidases CD39 et CD73 convertissent l'ATP et l'ADP en AMPC, puis en adénosine, respectivement. Les fonctions de l'adénosine sont médiées par quatre types de récepteurs purinergiques P1 : Adora1 (*Adenosine A1 receptor*), Adora2a, Adora2b et Adora3. La transduction du signal de l'adénosine se termine par le transfert de cette molécule du compartiment extracellulaire vers le milieu intracellulaire par les

ENTs (*Equilibrative nucleoside transporter*), suivi de son métabolisme en inosine par l'adénosine désaminase ou sa phosphorylation en AMPc par l'adénosine kinase (224).

Afin d'étudier le rôle de CD39 dans la thrombose veineuse, Yadav et al. ont induit la thrombose à des souris contrôles ou partiellement déficientes en CD39 (CD39<sup>+/-</sup>) en utilisant le modèle de sténose. CD39 ou ENTPD1 (*ectonucleoside tri(di)phosphohydrolase-1*) est une enzyme localisée à la surface leucocytaire et endothéliale. Cette enzyme catalyse le clivage hydrolytique des liaisons phosphodiester, dissipant ainsi les nucléotides extracellulaires purinergiques ATP et ADP. L'haplo-insuffisance de CD39 s'accompagne d'une augmentation de la thrombogénèse qui se traduit par une amplification du recrutement leucocytaire, une accumulation de fibrine, une exacerbation de la NETose et une activation locale du facteur tissulaire. Comme l'ATP est un substrat de CD39 et un inducteur de l'inflammasome NLRP3 via P2X7, les auteurs ont analysé l'impact de l'absence de CD39 sur NLRP3. Yadav et al. ont montré que la déficience partielle en CD39 est associée à une augmentation d'expression de NLRP3, d'ASC et de la caspase 1, ainsi qu'une potentialisation de la production d'IL-1 $\beta$ . De plus, la neutralisation d'IL-1 $\beta$  ou l'inhibition de son récepteur chez les souris CD39<sup>+/-</sup> réduit l'incidence de thrombose veineuse et atténue la taille du thrombus, soulignant le rôle crucial de cette cytokine pro-inflammatoire dans la thrombogénèse. En somme, l'ATP contribue à la thrombose veineuse via l'activation de l'inflammasome NLRP3 et cet effet prothrombotique peut-être inhibé par l'ectonucléotidase CD39 (225). En outre, le NLRP3 pourrait également participer à la thrombose veineuse en conditions hypoxiques. Dans ces conditions, l'activation du NLRP3 médiée par le facteur HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*) induit la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , favorisant l'agrégation plaquettaire (110). D'autre part, Anyanwu et al. ont caractérisé le rôle de CD39 dans la thrombose veineuse chez des souris totalement déficientes en CD39 (CD39<sup>-/-</sup>) en utilisant le modèle de stase. Ils ont constaté que l'absence de CD39 exacerbe la thrombose en augmentant le taux de la P-sélectine et de vWF, ainsi qu'en amplifiant la formation d'agrégats leuco-plaquettaire (226). Afin de confirmer le rôle prothrombotique de l'ATP, il serait intéressant d'administrer ce nucléotide aux souris CD39<sup>-/-</sup> et contrôles.

### **V.1.2. Protéine HMGB1**

HMGB1 est une protéine non-histone ubiquitaire qui présente plusieurs rôles en fonction de sa localisation subcellulaire. Dans le noyau, HMGB1 est une protéine chaperonne qui stabilise la formation du nucléosome alors que dans le cytoplasme, elle favorise l'autophagie

en se liant à la bécline 1. Une fois dans le milieu extracellulaire, HMGB1 agit comme une alarmine qui régule l'inflammation et les réponses immunitaires via plusieurs récepteurs (227). La position et l'activité d'HMGB1 sont affectées par les modifications post-traductionnelles. L'acétylation et la désacétylation de NLS1 (*nuclear localization signal 1*) et NLS2 orchestrent le déplacement de cette protéine entre le cytoplasme et le noyau. D'autre part, les réactions d'oxydoréduction modifient les résidus cystéine d'HMGB1 (C23, C45 et C106) et génèrent trois isoformes : fr-HMGB1 (*fully reduced HMGB1*), ds-HMGB1 (*disulfide HMGB1*) et ox-HMGB1 (*oxidized HMGB1*). La protéine HMGB1 entièrement réduite (fr-HMGB1), caractérisée par trois cystéines contenant des groupes thiol, forme un complexe avec CXCL2 et entraîne la migration des cellules immunitaires. La protéine HMGB1 partiellement réduite (ds-HMGB1), ayant un pont disulfure entre C23 et C45, déclenche les réponses inflammatoires. Par contre, la protéine HMGB1 entièrement oxydée (ox-HMGB1) est dépourvue d'activité chimiotactique (228). Les études ont montré que deux mécanismes pourraient conduire à la présence d'HMGB1 dans le milieu extracellulaire. HMGB1 peut être libérée de façon passive par les cellules nécrotiques présentant une altération de la membrane plasmique ou sécrétée de façon active par les cellules hématopoïétiques, y compris les leucocytes et les plaquettes. En revanche, le processus d'apoptose favorise la rétention nucléaire d'HMGB1. Au niveau extracellulaire, HMGB1 induit la production de cytokines, la migration, la prolifération et la différenciation en interagissant avec les récepteurs TLR2, TLR4, TLR9 et RAGE (229).

Afin de déterminer le rôle d'HMGB1 dans la MVTE, Stark et al. ont induit la thrombose veineuse à des souris contrôles et déficientes en HMGB1 au niveau des cellules sanguines (HMGB1<sup>-/-</sup>) en utilisant le modèle de sténose. Les auteurs ont observé une accumulation endothéliale d'HMGB1 chez les souris contrôles et une colocalisation de cette protéine avec les plaquettes et les NETs. La déficience en HMGB1 est associée à une réduction de la taille du thrombus et de l'incidence de thrombose, soulignant l'importance d'HMGB1 dans la MVTE. Par contre, l'inhibition pharmacologique d'HMGB1 via son antagoniste compétitif, la boîte A, s'accompagne uniquement d'une diminution de la taille du thrombus, suggérant l'interférence de la boîte A avec la propagation de la thrombogenèse sans affecter son initiation. Comme les cellules nécrotiques sont faiblement présentes au niveau de la lumière vasculaire, la protéine HMGB1 semble être libérée de façon active par les cellules hématopoïétiques. En vue de déterminer la source de cette protéine, Stark et al. ont transféré des plaquettes contrôles ou des neutrophiles contrôles aux souris HMGB1<sup>-/-</sup>. Seules les plaquettes contrôles restaurent le phénotype prothrombotique, confirmant l'origine plaquettaire d'HMGB1. La déficience en



TLR2, TLR4 ou RAGE n'altère pas la thrombose alors que l'absence de MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*), la molécule adaptatrice impliquée dans la transduction du signal de ces trois récepteurs, réduit la taille du thrombus et l'incidence de thrombose. Ces résultats démontrent que TLR2, TLR4 et RAGE agissent de façon synergique et présentent des fonctions redondantes dans la thrombogenèse. Les auteurs ont ensuite caractérisé les mécanismes moléculaires d'HMGB1 dans la MVTE. Ils ont constaté que cette protéine amplifie la NETose via le récepteur RAGE et contribue au recrutement et à l'activation des plaquettes d'une manière autocrine et paracrine. De plus, HMGB1 favorise l'influx des monocytes et l'augmentation d'expression du facteur tissulaire, d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  par l'intermédiaire de RAGE, TLR2 et MyD88. Finalement, des expériences in vivo et in vitro ont montré que les effets prothrombotiques sont médiés par l'isoforme partiellement réduit (ds-HMGB1). En somme, l'axe ds-HMGB1/MyD88 coordonne la NETose, l'activation des monocytes et l'agrégation plaquettaire dans la MVTE (102).

### **V.1.3. ARN extracellulaires**

En réponse aux dommages tissulaires, les acides nucléiques sont relargués dans le milieu extracellulaire. Comme décrits précédemment, les acides désoxyribonucléiques (ADN) extracellulaires ou NETs présentent des effets procoagulants dans les thromboses artérielles et veineuses. Dans cette partie, j'étudierai l'implication des ARN extracellulaires (ARNe) dans les maladies cardiovasculaires.

En fonction de la nature des stimuli, la composition d'ARNe (ARNm, microARN, ARN ribosomal ou ARN long non-codant) et son mode de libération peuvent varier. Ainsi, les ARNe peuvent être isolés, associés aux microvésicules ou former des complexes ribonucléoprotéiques. Par exemple, les patients atteints d'athérosclérose présentent une altération de plusieurs microARN qui pourront servir de cibles thérapeutiques ou de biomarqueurs (230) (231) (232). Afin de mettre en évidence l'importance des ARNe dans l'athérosclérose, Simsekylmaz et al. ont traité des souris *Apoe*<sup>-/-</sup> avec de l'ARNase 1. Les auteurs ont constaté une réduction du recrutement leucocytaire et de la plaque athéromateuse, ainsi qu'une diminution d'expression des cytokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion, soulignant le rôle athérogène des ARNe. Comme l'ARNase 1 dégrade les ARNe d'une manière non sélective, il n'est donc pas possible de déterminer la nature des ARNe contribuant à l'athérosclérose (233). Dans le syndrome d'ischémie et reperfusion, les ARNe favorisent la libération de TNF- $\alpha$ . Ce dernier amplifie l'expulsion des ARNe par rétrocontrôle

positif, créant ainsi un cercle vicieux. Par contre, l'administration d'ARNase 1 interfère avec l'interaction ARNe/TNF- $\alpha$ , réduisant ainsi la taille de l'infarctus, la production de cytokines et la génération d'enzymes antioxydantes (234). De même, une autre équipe a montré que le syndrome d'ischémie reperfusion est associé à une augmentation du taux d'ARNe circulants, y compris de microARN. De plus, l'ARNase 1 atténue le taux de cytokines, l'infiltration de neutrophiles et l'expression de la caspase-3. Cependant, la déficience en TLR3 (TLR3<sup>-/-</sup>) ou en sa molécule adaptatrice (Trif<sup>-/-</sup>) in vivo, préserve la fonction cardiaque et diminue la taille de l'infarctus sans altérer la réponse inflammatoire, suggérant que les effets des ARNe sont médiés indépendamment de l'axe TLR3/Trif dans l'infarctus du myocarde (235).

D'autre part, Fisher et al. ont caractérisé les effets vasculaires des ARNe. Ils ont remarqué que les ARNe augmentent la perméabilité vasculaire en mobilisant et stabilisant le VEGF. Ainsi, ce dernier active ultérieurement le récepteur VEGF-R2 et induit la désintégration des jonctions intercellulaires (236). D'un autre côté, l'équipe de Preissner a révélé que les ARNe chargés négativement activent la voie extrinsèque de coagulation en agissant comme cofacteurs de la sérine protéase FSAP (*Factor VII-activating protease*) (237). Cette même équipe a ensuite démontré que les ARNe stimulent la voie intrinsèque de coagulation dans la thrombose artérielle en favorisant l'auto-activation du FXII, du FXI, de la kallikréine et du kininogène de haut poids moléculaire (238). Néanmoins, la protéine anticoagulante HRG (*histidine-rich glycoprotein*) module la capacité des ARNe à activer la voie intrinsèque de coagulation et sa déficience (HRG<sup>-/-</sup>) accélère la thrombose artérielle in vivo (239). Outre leurs propriétés procoagulantes, les ARNe présentent des activités pro-inflammatoires. Ainsi, les ARNe favorisent le recrutement des leucocytes en induisant l'expression des molécules d'adhésion et contribuent à la polarisation des macrophages vers le phénotype M2. Cette différenciation des macrophages est caractérisée par l'augmentation des marqueurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- $\alpha$  (240). Malgré leurs pouvoirs pathogènes, les ARNe peuvent exercer des activités protectrices comme la régénération vasculaire. Une étude a mis en évidence la capacité des ARN de transfert et ribosomiaux, à promouvoir la vasculogénèse et la leucopoïèse des cellules souches embryonnaires de souris (241).

## V.2. TLRs dans la MVTE

### V.2.1. Historique et classification des TLRs

La découverte de la famille des TLRs débute par l'identification du récepteur Toll impliqué dans la polarisation dorso-ventrale chez la drosophile. En plus de son rôle dans l'embryogenèse des insectes, l'équipe de Jules Hoffmann a mis en évidence la contribution de ce récepteur à l'immunité innée en 1996. En effet, l'altération de la voie de signalisation du récepteur Toll s'accompagne d'un défaut de production d'un peptide antimicrobien appelé drosomycine et d'une augmentation de la mortalité des drosophiles au cours d'une infection fongique. En 1997, le premier homologue humain du récepteur Toll drosophilien a été cloné et caractérisé par Ruslan Medzhitov et Janeway (242). Les TLRs sont des protéines transmembranaires comprenant un ectodomaine de structure solénoïde riche en leucines, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire TIR (*toll-interleukin-1 receptor*) responsable de la transduction du signal. En raison d'homologie structurale du domaine cytoplasmique, les TLRs appartiennent à la superfamille des IL-1Rs (*interleukin-1 receptors*) (243). La famille des TLRs renferme 10 récepteurs humains (TLR1-TLR10) et 12 murins (TLR1–TLR9, TLR11–TLR13). Les études ont montré que le TLR10 murin n'est pas fonctionnel en raison d'une insertion rétrovirale dans le gène correspondant et que les TLR11, TLR12 et TLR13 ont été perdus du génome humain. En fonction de la localisation cellulaire et de la nature des ligands, les TLRs sont répartis en deux groupes. Le premier groupe est composé des TLRs exprimés au niveau de la membrane cellulaire et reconnaissant des lipides, des protéines et des lipoprotéines microbiennes (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR11). En revanche, le second groupe comporte les TLRs présents au niveau des compartiments intracellulaires et détectant des acides nucléiques microbiens et des DAMPs (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) (244) (Tableau 5).

**Tableau 5 : Implication des TLRs reconnaissant des DAMPs dans les maladies inflammatoires.**  
Tableau adapté de Cong et al. *Nature Reviews Immunology* 2020 (245).

Récepteur	Expression	DAMPs	Maladies inflammatoires	Références
<b>TLR2</b>	Ubiquitaire. Fortement exprimé par les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les neutrophiles.	HMGB1, HSPs, SNAPIN, versicane, biglycane, décorine, neurotoxine dérivée des éosinophiles, protéine A/D du surfactant, $\beta$ -défensine 3, histone, SAA, A $\beta$ et $\beta$ 2-glycoprotéine I.	Syndrome d'ischémie reperfusion, polyarthrite rhumatoïde, cancer et autres maladies inflammatoires.	(246), (247), (248), (249) et (250).
<b>TLR3</b>	Ubiquitaire. Fortement exprimé par les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les cellules NK.	ARNm, ARN interférents et ARN double-brin.	Syndrome d'ischémie reperfusion et autres maladies inflammatoires.	(246), (251), (252), (253) et (254).
<b>TLR4</b>	Ubiquitaire. Fortement exprimé par les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales.	HMGB1, ténascine C, HSPs, S100s, HMGN1, biglycane, décorine, sulfate d'héparine, acide hyaluronique, fibrinogène, fibronectine, $\beta$ -défensine 2, protéine A/D du surfactant, lactoferrine, élastase neutrophile, peroxyrédoxine, histone, SAA et lipoprotéines de faible poids moléculaire oxydées.	Syndrome d'ischémie reperfusion, polyarthrite rhumatoïde, cancer et autres maladies inflammatoires.	(246), (247), (255), (256), (257) et (258).
<b>TLR7</b>	Ubiquitaire. Fortement exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B.	Complexe IgG-ribonucléoprotéine et microARN.	Lupus érythémateux systémique et autres maladies inflammatoires.	(247) et (259).
<b>TLR9</b>	Ubiquitaire. Fortement exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B.	Complexe IgG-chromatine, ARN mitochondrial et HMGB1.	Lupus érythémateux systémique et autres maladies inflammatoires.	(247), (259) et (260).

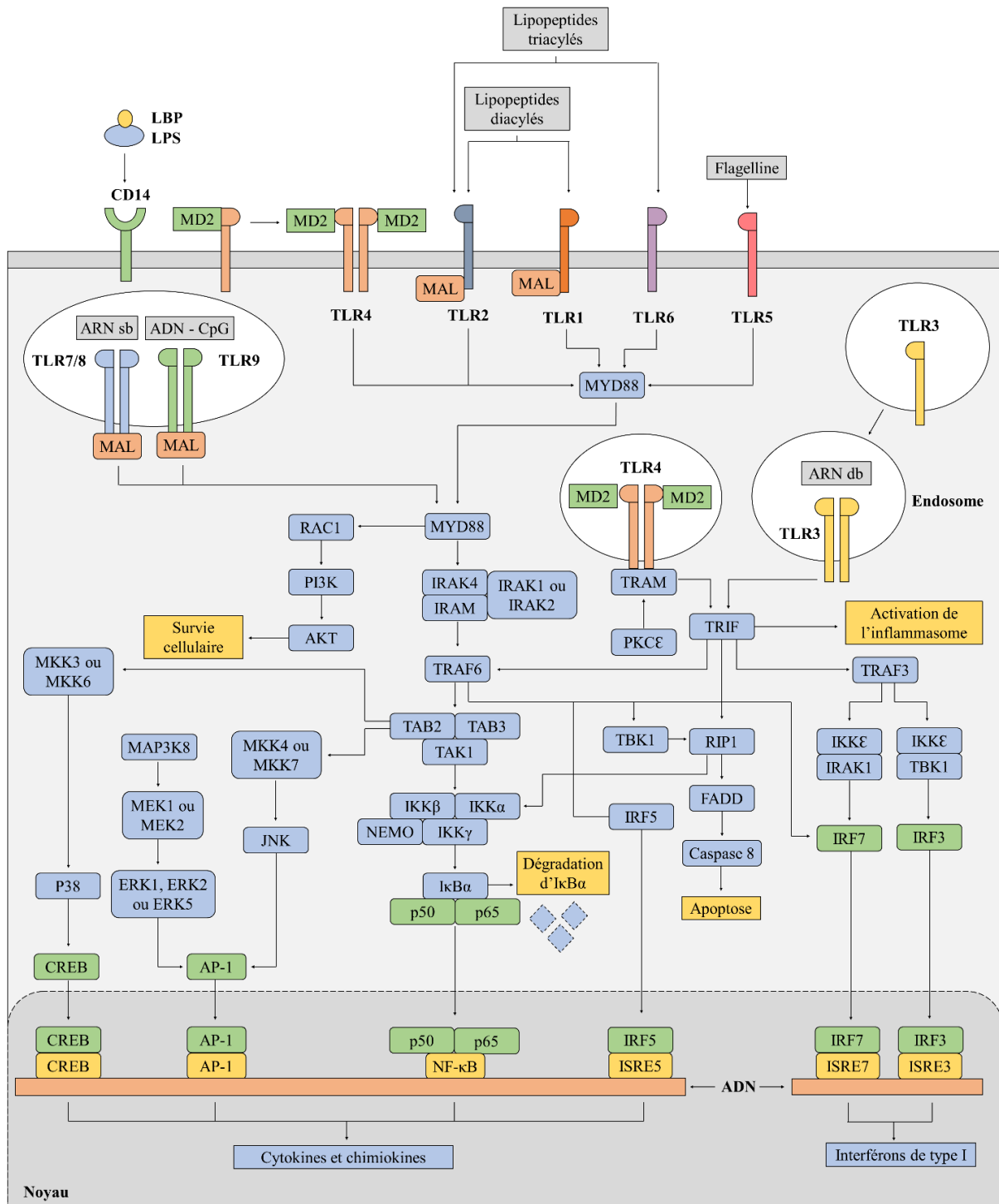
A $\beta$ , Amyloid  $\beta$ ; HMGN1, High-mobility group nucleosome binding domain 1; HSPs, heat shock proteins; SNAPIN, SNAP-associated protein; SAA, serum amyloid.

## V.2.2. Voies de signalisation des TLRs

Les TLRs sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique, mobilisés vers l'appareil de Golgi, puis transférés vers la membrane plasmique ou les compartiments intracellulaires. La protéine UNC93B1 (*Unc-93 homolog B1*) contrôle le trafic intracellulaire des TLRs du réticulum endoplasmique aux endosomes. Le clivage protéolytique des TLRs endosomaux médié par les cathepsines ou l'asparagine endopeptidase est indispensable à leur activation. Les TLRs déclenchent des voies de signalisation dépendantes de MyD88 ou de TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN $\beta$* ) (Figure 17). Tous les TLRs à l'exception du TLR3 activent la voie MyD88 alors que le TLR3 stimule la voie TRIF. Quant au TLR4, il est seul récepteur à pouvoir activer les deux voies. Suite à l'engagement des TLRs par leurs ligands correspondants, MyD88 recrute les membres de la famille des IRAKs : IRAK4, IRAK1, IRAK2 et IRAK-M. Au cours de la formation du Myddosome, IRAK4 active IRAK1 induisant son autophosphorylation. Après sa libération, IRAK1 s'associe à TRAF6 (*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6*) qui catalyse la polyubiquitination K63 de TRAF6 et de TAK1 (*Transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1*). L'interaction de TAK1 avec les sous-unités régulatrices TAB1, TAB2 et TAB3 entraîne son activation. À son tour, TAK1 stimule deux voies de signalisation différentes : IKK (*I $\kappa$ B Kinase*) et MAPK. Le complexe IKK est composé des sous-unités catalytiques IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , et de la sous-unité régulatrice NEMO (aussi appelée IKK $\gamma$ ). La liaison de TAK1 au complexe IKK favorise la phosphorylation et l'activation d'IKK $\beta$ . Ainsi, le complexe IKK phosphoryle la protéine inhibitrice de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , qui subit la dégradation protéasomique. Il s'ensuit la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B qui induit l'expression des gènes pro-inflammatoires. De même, TAK1 stimule les membres de la famille MAPK, tels que p38, ERK1/2 et JNK, qui activent les facteurs de transcription CREB (*cAMP-responsive element-binding protein*) et AP-1 (*activator protein 1*) (243) (261) (262).

D'autre part, TRIF interagit avec TRAF6 et TRAF3. TRAF6 recrute la kinase RIP-1 (*receptor-interacting protein 1*) qui induit l'expression des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires via l'activation de TAK1. En revanche, TRAF3 recrute des IKKs non-canoniques, TBK1 et IKKi (IKK $\epsilon$ ), qui stimulent la phosphorylation d'IRF3, sa translocation nucléaire et l'expression d'interférons de type I. De plus, il a été démontré que la famille Pellino d'ubiquitine-ligases est impliquée dans la transduction du signal des TLRs. En effet, la phosphorylation de Pellino-1 par le complexe TBK1/IKKi facilite l'ubiquitination et le recrutement de RIP-1. De surcroît, la liaison de Pellino-1 au facteur de transcription DEAF

(*Deformed Epidermal Autoregulatory Factor 1*) favorise la fixation d'IRF3 au promoteur d'IFN- $\beta$ . Afin de limiter l'activation excessive du système immunitaire inné, plusieurs molécules régulent négativement les voies de signalisation des TLRs. La voie MyD88 est inhibée par ST2825, SOCS1 (*Suppressor of cytokine signaling protein 1*) et Cbl-b (*Casitas B-lineage lymphoma b*), alors que la voie TRIF est réprimée par SARM (*Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein*) et TAG. SOCS3 et DUBA (*Deubiquitinating enzyme A*) assurent la suppression de TRAF3, tandis que CYLD, A20, USP4 (*Ubiquitin Specific Peptidase 4*), TANK (*TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator*), TRIM38 (*Tripartite motif 38*) et SHP modulent négativement TRAF6 (243) (261) (262).



**Figure 17 : Voies de signalisation des TLRs.** TLR2-TLR1, TLR2-TLR6 et TLR5 sont présents au niveau de la membrane plasmique et détectent les composants membranaires microbiens. TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont localisés au niveau des compartiments intracellulaires et reconnaissent les acides nucléiques endogènes et microbiens. TLR4 est situé à la fois au niveau de la surface cellulaire et de l'endosome. La transduction du signal des TLRs via les voies MyD88 et TRIF induit la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, la sécrétion d'interférons de type I, l'apoptose ou la survie cellulaire. AP-1, activator protein 1; CREB, cAMP-responsive element-binding protein; dsDNA, double-stranded DNA; dsRNA, double-stranded RNA; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FADD, FAS-associated death domain; IκBα, inhibitor of NF-κBα; IKK, inhibitor of NF-κB kinase;

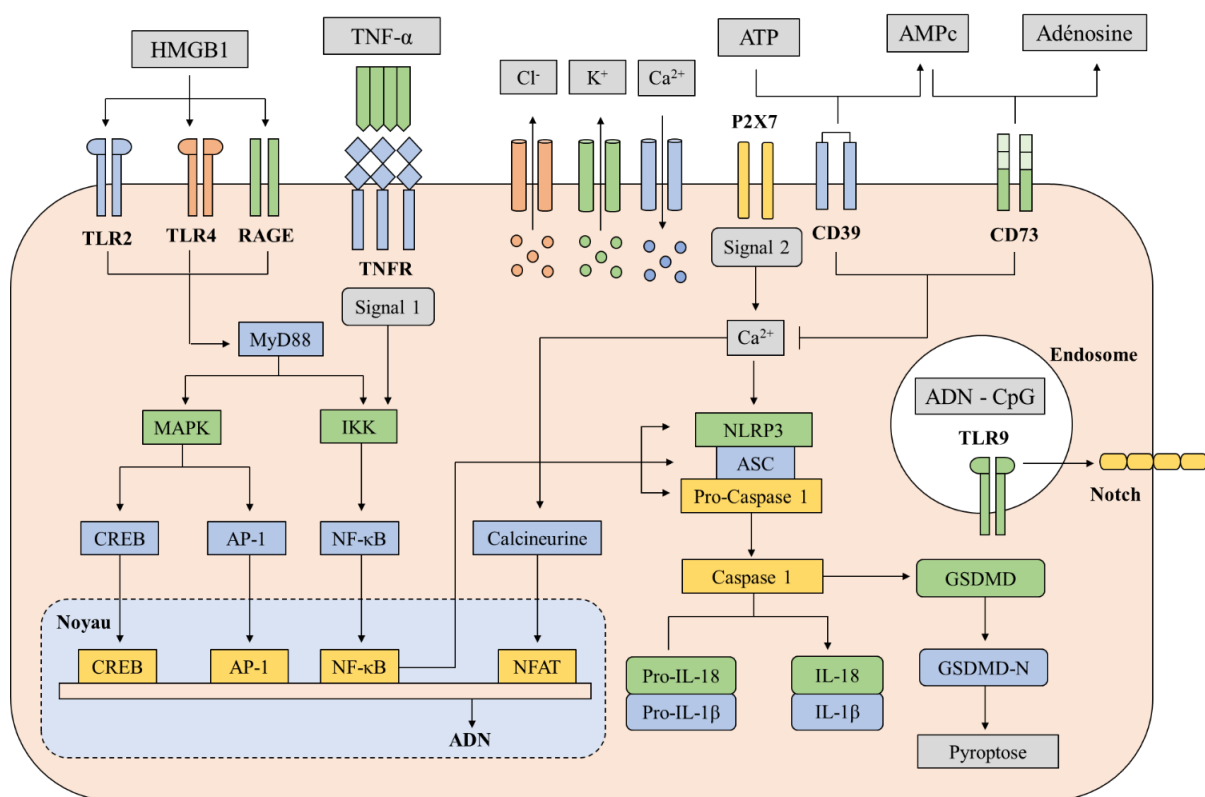
IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase; IRF, IFN-regulatory factor; ISRE, IFN-stimulated response element; JNK, JUN N-terminal kinase; LBP, LPS-binding protein; LPS, lipopolysaccharide; MAL, MYD88 adaptor-like protein; MAP3K, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8; MD2, myeloid differentiation factor 2; MEK, mitogen-activated protein kinase/ERK kinase; MKK, mitogen-activated protein kinase kinase; NEMO, NF- $\kappa$ B essential modulator; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC $\epsilon$ , protein kinase C $\epsilon$ ; RIP1, receptor-interacting protein 1; ssRNA, single-stranded RNA; TAB, TAK1-binding protein; TAK1, TGF $\beta$ -activated kinase 1; TBK1, TANK-binding kinase 1; TRAF, tumour necrosis factor receptor-associated factor; TRAM, TRIF-related adaptor molecule. Figure adaptée de J. Gay et al. *Nature Reviews Immunology* **2014** (262).

### V.2.3. TLR9 dans la MVTE

Le rôle des TLRs dans la MVTE a été peu étudié. Cependant, Henke et al. ont caractérisé la contribution du récepteur TLR9 à la MVTE. Ce récepteur endosomal reconnaît les séquences d'ADN contenant les motifs Cytosine-phosphate Guanine (CpG) non méthylés. Afin d'identifier le rôle du TLR9 dans la MVTE, les auteurs ont induit la thrombose veineuse à des souris contrôles et déficientes en TLR9 (TLR9<sup>-/-</sup>) en utilisant le modèle de stase. Ils ont constaté une augmentation de la taille du thrombus de 20% chez les souris TLR9<sup>-/-</sup> par rapport aux souris témoins à J2 et J8. Des résultats similaires ont été obtenus à J2 en inhibant pharmacologiquement TLR9 via l'administration d'ODN-2088. L'augmentation de la taille du thrombus des souris TLR9<sup>-/-</sup> à J2 s'accompagne d'une amplification de l'influx des neutrophiles et des monocytes. De plus, les souris TLR9<sup>-/-</sup> présentent une altération de la maturation du thrombus qui se manifeste par une réduction de la fibrose et de la néovascularisation à J8. En vue de déterminer si le retard de la résorption du thrombus des souris TLR9<sup>-/-</sup> résulte d'une augmentation de la thrombogenèse ou d'un défaut de thrombolyse, les paramètres de coagulation ont été mesurés. Henke et al. ont remarqué une augmentation du complexe d'activation de la coagulation thrombine-antithrombine (TAT) et une diminution du fibrinogène libre chez les souris TLR9<sup>-/-</sup>. Par contre, la déficience en TLR9 n'affecte pas le FX, la plasmine et les taux sériques d'uPA et de PAI-1. Ainsi, ces résultats suggèrent que le TLR9 accélère la résorption du thrombus en réduisant la thrombogenèse sans altérer la thrombolyse. En outre, la déficience en TLR9 est associée à une altération des cytokines de type Th1 qui se traduit par une réduction du taux d'IFN- $\alpha$ , d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-2 au niveau de la paroi veineuse. D'autre part, la présence d'ADN double-brin au niveau du thrombus et l'absence de croissance bactérienne confirment l'activation de TLR9 en condition stérile au cours de la MVTE. Pour décrypter la voie de signalisation de TLR9 dans la MVTE, les auteurs ont induit la thrombose à des souris déficientes en MyD88 (MyD88<sup>-/-</sup>). Étant donné que l'absence de MyD88 n'affecte



pas la taille du thrombus à J2, la transduction du signal de TLR9 ne semble donc pas être médiée par la molécule adaptatrice MyD88. Tout comme la déficience en TLR9, la neutralisation de DDL4 (*Delta-like 4*), un ligand de la voie Notch, augmente la taille du thrombus et atténue le taux de fibrinogène libre et d'IL-1 $\alpha$ , suggérant l'implication de la voie Notch dans la transduction du signal de TLR9. Finalement, le traitement des souris témoins avec l'agoniste synthétique de TLR9, ODN-1826, diminue la taille du thrombus en réduisant le complexe TAT. Ainsi, cet article a montré que l'axe TLR9-Notch activé par les ADN extracellulaires, accélère la résorption du thrombus en réduisant la thrombogénèse (Figure 18) (263).



**Figure 18 : Interconnexion des voies de signalisation des DAMPs dans la thrombose veineuse profonde.** L'activation synergique des récepteurs TLR2, TLR4 et RAGE par la protéine HMGB1 contribue à la MVTE. D'autre part, l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 fait intervenir deux signaux. Le signal 1 médié par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , augmente l'expression des composants de l'inflammasome via la voie NF- $\kappa$ B. Le signal 2 induit par le complexe ATP/P2X7 conduit à l'efflux de Cl<sup>-</sup> et de K<sup>+</sup>, ainsi qu'à l'influx de Ca<sup>2+</sup>. L'augmentation de la concentration intracellulaire calcique favorise l'oligomérisation de NLRP3 et l'activation de la caspase 1. Cette dernière catalyse le clivage protéolytique des pro-cytokines cytosoliques et de la gasdermine D. Il s'ensuit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et la pyroptose. Le calcium pourrait également stimuler la calcineurine, entraînant la déphosphorylation de NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) et sa migration nucléaire. Les ectonucléotidases CD39 et CD73 inhibent l'effet prothrombotique de l'ATP en le convertissant en adénosine. Quant à l'axe TLR9/Notch, il exerce un effet antithrombotique en accélérant la résorption du thrombus.

# RÉSULTATS

## VI. Présentation des travaux de recherche

### VI.1. Article 1

#### VI.1.1. Présentation de l'article 1

Comme exposée dans l'introduction, la MVTE constitue un enjeu majeur de santé publique en raison de sa forte morbi-mortalité. Cette pathologie multifactorielle comprenant la TVP et l'EP, survient en conditions stériles et implique l'intervention de l'immunité innée et adaptative. Malgré la prise en charge de la MVTE avec les ACOD, les risques de récurrence et de saignements sont toujours présents. Afin d'éviter le risque de saignement, il faut développer en complément des thérapies ciblées n'interférant pas avec la cascade de coagulation. C'est pourquoi, il est nécessaire de caractériser précisément et plus largement les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la MVTE.

Au cours de la MVTE, les cellules apoptotiques et nécrotiques relarguent non seulement de l'ATP, de la HMGB1 et de l'ADN, mais également de l'ARN. Les ARN extracellulaires (ARNe) contribuent à plusieurs maladies cardiovasculaires, notamment le syndrome d'ischémie et de reperfusion, l'infarctus du myocarde et la thrombose artérielle. Toutefois leur rôle dans la MVTE reste inconnu. Outre leur capacité à activer les voies intrinsèque et extrinsèque de coagulation en agissant comme cofacteurs de la sérine protéase FSAP, du FXII, du FXI, de la kallikréine et du kininogène dans la thrombose artérielle, les ARNe pourraient être des ligands endogènes du TLR3 (237) (238) (253). Ce dernier est un récepteur endosomal reconnaissant l'ARN double brin (dsRNA) associé aux infections virales et son analogue synthétique poly(I:C) (*polyinosinic-polycytidylic acid*), l'ARNm endogène et les petits ARN interférents (252) (253) (254). La signalisation du TLR3 nécessite la phosphorylation des résidus tyrosine du domaine TIR et l'intervention de la PI3K (264) (265). Des études cristallographiques ont permis d'identifier la structure du TLR3. L'ectodomaine du récepteur est constitué de 25 motifs LRR (*Leucine-rich repeat*) et est caractérisé par une forme de « fer à cheval » augmentant la surface de contact avec l'ARN double brin. Ce dernier se lie à deux sites différents des extrémités N et C terminales du côté latéral de la surface convexe de l'ectodomaine de TLR3, conférant une stabilité suffisante pour permettre à ce récepteur de former un homodimère via la région C-terminale (266) (244). D'autres études ont montré que le TLR3 exerce une activité antivirale en favorisant la production d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires. En effet, la déficience en TLR3 est associée à une infection létale

au cytomégalo virus chez la souris et à une augmentation de la susceptibilité au virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) chez l'homme (267) (268). En plus de son activité antivirale, ce récepteur est impliqué dans l'hypercoagulabilité et la dysfonction endothéliale. En effet, Shibamiya et al. ont démontré que l'activation de TLR3 par le poly(I:C) augmente l'expression du facteur tissulaire et réduit celle de la thrombomoduline au niveau des cellules endothéliales (269). De plus, le TLR3 participe à la dysfonction endothéliale en altérant la vasodilatation, potentialisant la production des dérivés réactifs de l'oxygène et limitant la régénération endothéliale (270). Cependant, son rôle dans la MVTE n'est pas encore élucidé.

Les objectifs de mon travail de recherche consistent alors à :

- 1) Déterminer les mécanismes prothrombotiques de l'axe ARNe/TLR3 dans la MVTE.
- 2) Confirmer que l'ARNe est un ligand endogène du TLR3, en particulier dans les cellules endothéliales.

### **VI.1.2. Résultats de l'article 1**

Le TLR3 est un récepteur ubiquitaire fortement exprimé par les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales, dendritiques et NK. Comme décrites dans l'introduction, les cellules endothéliales jouent un rôle crucial dans la MVTE. En effet, elles présentent un effet procoagulant en augmentant l'expression du facteur tissulaire et en réduisant celle des molécules anticoagulantes naturelles. En outre, les cellules endothéliales favorisent le recrutement des cellules immunitaires en exprimant des molécules d'adhésion ou en sécrétant des cytokines chimiotactiques (89). C'est pourquoi, j'ai étudié le rôle du TLR3 endothélial dans la régulation des mécanismes prothrombotiques cités ci-dessus, en ayant recours à des expériences in vitro et in vivo.

Étant donné que les souris ne développent pas spontanément de thromboses, j'ai induit la thrombose à des souris témoins et déficientes en TLR3 (TLR3<sup>-/-</sup>) en utilisant le modèle de FeCl<sub>3</sub>. Ce modèle a pour but de générer des dommages endothéliaux, favorisant la libération de l'ARN intracellulaire. Dans un premier temps, j'ai vérifié la présence d'ARNe au niveau du thrombus des souris témoins via un marqueur fluorescent spécifique de l'ARN, le Syto RNA Select. Afin de démontrer l'importance de l'ARNe dans la MVTE, les souris témoins ont reçu l'enzyme dégradant l'ARN, l'ARNase, avant l'induction de la thrombose. J'ai constaté que l'administration d'ARNase s'accompagne d'une réduction de la taille du thrombus ainsi qu'une diminution de l'accumulation des neutrophiles et des monocytes, suggérant un rôle crucial de

l'ARNe dans la MVTE. Dans un second temps, j'ai analysé l'impact du TLR3 sur la MVTE en traitant les souris témoins et TLR3<sup>-/-</sup> avec du poly(I:C) avant l'induction de la thrombose. J'ai remarqué une augmentation de la taille du thrombus ainsi qu'une amplification du recrutement des neutrophiles et de la NETose chez les souris exprimant le TLR3 et recevant du poly(I:C), soulignant la contribution de ce récepteur à la MVTE. En vue de vérifier que l'effet prothrombotique de l'ARNe est médié par le TLR3, les souris témoins et TLR3<sup>-/-</sup> ont reçu de l'ARN extrait de cellules endothéliales murines ou du véhicule. De même, j'ai observé une augmentation de la taille du thrombus et de l'infiltration des neutrophiles chez les souris exprimant le TLR3 et traitées avec de l'ARNe. Ces résultats montrent que l'axe ARNe/TLR3 participe à la MVTE via le recrutement des neutrophiles.

Comme les neutrophiles humains n'expriment pas le TLR3, j'ai voulu déterminer le mécanisme indirect à travers lequel le TLR3 endothélial coordonne le recrutement des neutrophiles (271). Tout d'abord, j'ai évalué l'expression d'ARNm de la cytokine chimiotactique IL-8, au niveau des cellules endothéliales humaines HUVECs (*Human umbilical vein endothelial cells*) transfectées avec un siRNA contrôle (CTR) ou un siRNA dirigé contre le TLR3, et traitées avec du véhicule ou du poly(I:C). L'expression d'ARNm de l'IL-8 est augmentée au niveau des HUVECs exprimant le TLR3 (siRNA CTR) et traitées avec du poly(I:C). Ces résultats suggèrent que le TLR3 endothélial contrôle indirectement le recrutement des neutrophiles via la production d'IL-8. Pour analyser le rôle fonctionnel de l'IL-8 sur le recrutement des neutrophiles, j'ai utilisé la technique de Boyden Chamber. Cette technique consiste à ensemencher des neutrophiles au niveau d'une membrane poreuse permettant le passage des cellules, et à les incuber avec des milieux riches ou pauvres en IL-8, en présence ou en l'absence d'un antagoniste du récepteur de l'IL-8, le CXCR2. Les milieux riches en IL-8 sont issus des HUVECs exprimant le TLR3 (siRNA CTR) et traitées avec du poly(I:C), alors que les milieux pauvres en IL-8 dérivent des HUVECs déficientes en TLR3 (siRNA TLR3) quel que soit le traitement. Ainsi, les milieux riches en IL-8 entraînent la migration des neutrophiles et cet effet est inhibé en présence de l'antagoniste de CXCR2. En revanche, les milieux pauvres en IL-8 n'augmentent pas la migration des neutrophiles, indépendamment de la présence ou de l'absence de l'antagoniste de CXCR2. Ces résultats démontrent que l'activation du TLR3 endothélial par le poly(I:C) stimule la sécrétion d'IL-8. Cette cytokine chimiotactique se lie au récepteur CXCR2 exprimé par les neutrophiles, induisant leur recrutement. Afin de valider ces données chez la souris, j'ai étudié l'expression d'ARNm et la sécrétion de l'un des homologues murins d'IL-8, le CXCL5. Les cellules endothéliales murines exprimant le TLR3 et traitées

avec de l'ARNe ou du poly(I:C), présentent une augmentation d'expression et de production de CXCL5, ce qui n'est pas le cas avec les cellules endothéliales murines TLR3<sup>-/-</sup>.

En plus du recrutement des neutrophiles, j'ai déterminé l'effet de l'ARNe sur la coagulation en évaluant la formation des caillots de plasma à travers le test de turbidimétrie. Ce test consiste tout d'abord à traiter les HUVECs avec du poly(I:C) ou de l'ARNe, puis à les incuber avec du plasma humain afin de mesurer le taux de fibrine à 405 nm. Le traitement des cellules avec de l'ARNe conduit à une augmentation de l'absorbance maximale et de l'aire sous la courbe, indiquant une amplification de la coagulation. À l'inverse du poly(I:C), l'ARNe ne réduit pas le temps de latence ni la pente, illustrant l'absence d'effet sur la vitesse de coagulation. Cette potentialisation de la coagulation est associée à une diminution d'expression d'ARNm du TFPI, sans toutefois altérer celles du TF et de la TM.

Mon deuxième objectif était de confirmer que l'ARNe est un ligand du TLR3. Pour démontrer que les effets de l'ARNe sont médiés par le TLR3, j'ai surexprimé ce récepteur dans les cellules HEK293T qui ont été ensuite traitées avec du poly(I:C) ou de l'ARNe. J'ai ensuite analysé l'activation des voies de signalisation et l'expression des gènes cibles de ce récepteur par western blot et RT-PCR en temps réel. La phosphorylation de NF- $\kappa$ B est augmentée dans les cellules HEK293T transfectées avec un plasmide d'expression pour le TLR3 et traitées avec de l'ARNe ou du poly(I:C) pendant 30 minutes. En revanche, cet effet n'est pas observé dans les cellules transfectées avec un plasmide vide, quel que soit le traitement. De plus, j'ai évalué l'expression des gènes cibles suivants : IFN- $\beta$ , ISG56, IFIT2, TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8. Une augmentation d'expression d'IFN- $\beta$  est détectée dans les cellules HEK293T surexprimant le récepteur TLR3 et traitées avec de l'ARNe ou du poly(I:C) pendant 4h. En somme, l'activation de la voie de signalisation de TLR3 par l'ARNe et l'augmentation d'expression de son gène cible montrent que l'ARNe est bien un ligand de ce récepteur.

Cet article a été soumis au journal JAHA (*Journal of the American Heart Association*) et plusieurs questions ont été soulevées. En plus de la surexpression du TLR3 dans les cellules HEK293T, je vais transfecter des HUVECs avec un siRNA dirigé contre le TLR3 et vérifier que cela inhibe l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et l'expression d'IFN- $\beta$ . L'inhibition de ce récepteur dans les HUVECs permettra de confirmer d'une manière plus physiologique que l'ARNe est un ligand endogène du TLR3 endothélial. D'autre part, je vais évaluer si l'ARNe induit également la production d'IL-8 par les HUVECs et si ce milieu riche en IL-8 contribue au recrutement des neutrophiles de la même façon que le poly(I:C). D'autre part, les « reviewers » demandent que mes résultats in vivo soient confirmés par un autre modèle de thrombose

veineuse plus proche de la physiologie et bien établi dans la littérature. Je suis donc en train de caractériser les effets prothrombotiques de l'ARNe et du poly(I:C) en utilisant le modèle de stase veineuse. La taille du thrombus, l'infiltration des neutrophiles, la NETose et le complexe thrombine-antithrombine (TAT) seront quantifiés chez des souris témoins traitées avec du véhicule, du poly(I:C) ou de l'ARNe. Finalement, je vais vérifier que les ARNe relargués ne sont pas dégradés par les ribonucléases et peuvent donc induire leur effets pro-thrombotiques en dosant leurs taux plasmatiques chez des souris ayant subi la thrombose veineuse avec les modèles de FeCl<sub>3</sub> et de stase.



**Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.**

**URL:** <https://atvb-submit.aha-journals.org/>

**Manuscript Number:** ATVB/2022/317543

**Title:** Extracellular RNA induce neutrophil recruitment via endothelial TLR3 during venous thrombosis after vascular injury

**Authors:**

Catherine Lemarie (Inserm 1304, GETBO)

For ATVB Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.



## **Extracellular RNA induce neutrophil recruitment via endothelial TLR3 during venous thrombosis after vascular injury**

<sup>1</sup>Maria Y. Najem, <sup>2</sup>Ryan N. Rys, <sup>2,3</sup>Sandrine Laurance, <sup>2,4</sup>François-René Bertin, <sup>1</sup>Virginie Gourdou-Latyszenok, <sup>1</sup>Lénaïck Gourhant, <sup>1</sup>Rozenn Le Corre, <sup>1</sup>Francis Couturaud, <sup>2,5</sup>Mark D. Blostein and <sup>1,2,5\*</sup>Catherine A. Lemarié

<sup>1</sup>Inserm, Univ Brest, CHRU Brest, UMR 1304, GETBO, Brest, France; <sup>2</sup>Lady Davis Institute for Medical Research; <sup>3</sup>Université de Paris and Université des Antilles, INSERM, BIGR, F-75015 Paris, France; <sup>4</sup>School of Veterinary Science, The University of Queensland, Gatton, Queensland, Australia and <sup>5</sup>Department of Medicine, Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, McGill University, Montreal, Québec, Canada.

Running Title: eRNA/TLR3 axis promotes venous thrombosis

The authors have declared that no conflict of interest exists.

\* Correspondence and material requests should be addressed to Catherine A. Lemarié

Address: UMR 1304 - GETBO

UFR Médecine

22 rue Camille Desmoulins

29238 Brest, France

Ph: +33 2 98 01 69 56

E-mail: catherine.lemarie@inserm.fr

ORCID: 0000-0002-3897-4287

Twitter: @CatLemarie

Key words: Venous thromboembolism, eRNA, TLR3, endothelial cell, neutrophil.

Word Count of body: 6023 words

Total number of figures and tables: 7

## **Abstract**

### **Objective:**

Venous thromboembolism is associated with endothelial cell activation that participate in the inflammation-dependent activation of the coagulation system. Cellular damages are associated with the liberation of different species of extracellular RNA (eRNA) involved in inflammation and coagulation. TLR3, which recognizes (viral) double-stranded RNA, single-stranded RNA, and also self-RNA fragments may be the receptor of these eRNA release during venous thromboembolism. We investigate how eRNA are regulating endothelial function through TLR3 contributing to venous thromboembolism.

### **Approach and results:**

Thrombus formation and size in WT and TLR3 deficient (-/-) mice were monitored by ultrasonography two days after thrombosis induction using the FeCl<sub>3</sub> model. Mice were treated with RNase1, poly (I:C) or RNA extracted from murine endothelial cells (eRNA). Gene expression and signaling pathway activation were analyzed in HEK293T cells overexpressing TLR3 in response to eRNA. Plasma clot formation on treated HUVECs was analyzed. Thrombosis exacerbated RNA release in vivo and increased RNA content within the thrombus. RNase1 treatment reduced thrombus size compared to control mice. Poly (I:C) and eRNA treatments increased thrombus size in WT mice but not in TLR3<sup>-/-</sup> mice, by bolstering neutrophil recruitment. Mechanistically, TLR3 activation in endothelial cells promotes CXCL5 secretion and neutrophil recruitment in vitro. eRNA triggered plasma clot formation by reducing TFPI mRNA expression. eRNA mediate these effects through TLR3-dependent activation of NFκB.

### **Conclusion:**

We show that venous thromboembolism is associated with eRNA liberation and TLR3 activation contributing to neutrophil recruitment, secretion of CXCL5 and modulation of coagulation through TFPI.

## **Non-standard Abbreviations and Acronyms**

DAMP: Damage-associated molecular pattern

DVT: Deep vein thrombosis

eRNA: Extracellular RNA

IVC: Inferior vena cava

NET: Neutrophil extracellular trap

PAMP: Pathogen-associated molecular pattern

TF: Tissue factor

TFPI: Tissue factor pathway inhibitor

TLR3: Toll-like receptor 3

VTE: Venous thromboembolism

## Introduction

Venous thromboembolism (VTE), which includes deep-vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE), is a common condition affecting 1% to 2% of the population, with an annual incidence of 1 in 500<sup>1</sup>. VTE can lead to death through PE in 10% of cases, result in the post-thrombotic syndrome in 30% of VTE presenting as DVT, characterized by chronic leg pain, swelling, and ulceration, or in chronic pulmonary hypertension in 4% of cases resulting in significant chronic respiratory compromise and mortality<sup>2,3</sup>. VTE is a multifactorial disease involving acquired or inherited risk factors. Among these, surgery and trauma are among the most common risk factors associated with VTE. Both VTE and acute inflammation share an increase in endothelial and platelet activation raising the possibility that factors derived from the inflamed endothelium and/or activated platelets may contribute to the thrombotic response. Moreover, studies showed that innate immunity is involved in the formation of venous thrombosis<sup>4-6</sup>. Interestingly, data obtained in mice suggest that aberrant activation of immunity during thrombosis is a key event in the initiation and propagation of venous thrombosis. Indeed, it is now well established that VTE starts as sterile inflammation with a massive recruitment of neutrophils and monocytes<sup>4,7</sup>.

Sterile inflammation is associated with the release or production of damage-associated molecular pattern (DAMP) including DNA, RNA or ATP. Toll-like receptors (TLRs) are a critical component of the innate immune system. They participate in host defense against foreign pathogens via the pathogen-associated molecular pattern (PAMP) recognition. TLRs respond not only to foreign pathogen structures but also to host-derived molecules that are produced by injured tissues and cells<sup>8</sup>. Studies demonstrated that short RNA sequences similar to those seen in RNA interference or mRNA are sufficient to stimulate TLR3<sup>9</sup>. TLR3 was described as the receptor of double-stranded (ds)RNA, a by-product of viral replication, in the endosome. In addition, TLR3 has been increasingly linked to tissue damage. Hence, endogenous RNA released from healthy and apoptotic cells or damaged tissue has been correlated with TLR3 expression and signaling<sup>9,10</sup>. TLR3 was proposed to be the sensor of endogenous RNA.

Activation of endothelial TLR3 is involved in endothelial dysfunction and disruption of the hemostatic balance in endothelial cells<sup>11,12</sup>. TLR3 deficiency was shown to protect mice against inflammatory responses in both septic and necrotic processes in the damaged gastrointestinal tract<sup>13</sup>. In addition, TLR3 deficiency reduced myocardial infarction damage after ischemia/reperfusion<sup>14</sup>. Reports indicate that extracellular RNA (eRNA), generated during tissue damage and inflammation in the presence or absence of infection, can exert pro-thrombotic and pro-inflammatory properties in the vascular system. eRNA were found to augment the (auto-) activation of proteases in the contact phase pathway of blood coagulation such as factors XII and XI, both exhibiting strong RNA binding<sup>15</sup>. eRNA were also found to mediate leukocyte adhesion *in vivo* and *in vitro* by promoting vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression from endothelial cells and tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) secretion by monocytes<sup>16</sup>. In addition, eRNA accumulate in atherosclerotic plaques and induce a pro-inflammatory phenotype from

macrophages<sup>17</sup>. Of note, pro-inflammatory and pro-thrombotic agents can induce the release of RNase1 from endothelial cell granule stores (Weibel-Palade bodies). RNase1 treatment was shown to reduce atrial thrombosis, infarct size after stroke, as well as limit cerebral edema and atherosclerosis<sup>14,15,17,18</sup>. However, it remains unknown if eRNA can impact endothelial cell functions during VTE. Thus, we hypothesize that eRNA may be involved in the inflammatory development of VTE via TLR3.

For ATVB Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

## Materials and Methods

### *Animals*

Male C57Bl/6N and B6N.129S1-Tlr3<sup>tm1Flv</sup>/J (TLR3 deficient) from Jackson Laboratory aged between 8-12 weeks were used for the study. All procedures described were approved by the Animal Care Committee at McGill University.

### *Treatments and venous thrombosis model*

Prior to thrombosis induction, mice received an intravenous injection of either vehicle, Syto RNA Select (25 µmol/L, Molecular Probes), RNase I (0.3 µg/µL, Fermentas), polyinosine-polycytidylic acid (poly(I:C), 5 µg/mL, Invivogen) or mRNA extracted from murine endothelial cells (10 µg/mL). The ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>, 0.18 M) model of thrombosis was used as previously described<sup>19</sup>. Thrombus cross sectional area was measured using high frequency ultrasonography (HFUS) as previously described<sup>20,21</sup>. In separate groups of mice, thrombi were dissected out directly from the inferior vena cava (IVC), blotted dry and weighted.

### *Hematoxylin /eosin and immunofluorescent staining*

Thrombi were embedded in OCT and serial 7-µm frozen sections were cut using cryostat and transferred onto gelatin-coated slides. For histology, slides were stained by hematoxylin and eosin (H&E). Thrombus area was quantified using ImageJ software (NIH). For immunofluorescence staining, samples were incubated with 0.5% Triton X-100 for 10 min followed by 10% BSA for 30 min at room temperature. The sections were incubated for 1 h at room temperature in 0.3% BSA in PBS with a rat anti-mouse Ly6G (BD Bioscience) and rabbit anti-mouse CitH3 (Abcam) antibodies. After washing, sections were incubated with the 555- and 488-nm Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies in 0.3% BSA in PBS for 1 h at room temperature. Nuclei were labeled with DAPI.

### *Isolation of human neutrophil*

Human neutrophils were isolated from whole blood. Blood was drawn in EDTA tubes. Blood was layered on lympholyte-poly (Cedarlane) and centrifuge 30 min at 500x g. After centrifugation, two leukocyte bands were visible. The polymorphonuclear band (lower band) was collected and resuspend in culture media. Cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 10 mmol/L HEPES, 1.5 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Wisent).

### *Endothelial cell culture and cell transfection*

Endothelial cells from WT and TLR3<sup>-/-</sup> mice were prepared as previously described<sup>19,22</sup>. Briefly, endothelial cells were purified by two consecutive immuno-selection procedures using magnetic beads conjugated with anti-ICAM-2 antibody (BD Pharmingen) and plated into 75 cm<sup>2</sup> tissue culture coated flasks. Endothelial cells were grown in endothelial cell basal medium (EBM-2) supplemented with an

endothelial cell bullet kit (EGM-2) (Lonza) and used between passage 3 and 5 in tissue culture dishes coated with 0.1% gelatin and maintained at 37°C in a humidified incubator at 5% CO<sub>2</sub>. For experiments, endothelial cells were incubated with 5 µg/mL poly(I:C) or with 20 µg/mL of extracellular RNA prepared as described below for 4h.

HUVECs (Promocell) were grown in the same conditions as murine endothelial cells and used between passage 3 and 6. HUVECs were transfected with a negative control small interference (si)RNA or siRNA (150 pmol) targeting TLR3 (Santa Cruz Biotechnology) and then incubated with 5 µg/mL poly(I:C). A maximum of gene silencing was observed after 48 h of transfection as shown by quantitative real-time PCR. When indicated HUVECs were also treated with 10 µg/mL of extracellular RNA prepared as described below

#### *HEK 293T plasmid transfection*

HEK 293T were transfected with a human TLR3 plasmid or an empty vector (Addgene). Briefly, 400 000 cells were plated in 6 well plates in high glucose DMEM supplemented with 10% FBS. The next day, 2 µg of pcDNA3 or TLR3 plasmids were mixed with the transfection reagent (JetPrime, Ozyme) and added to the cells for 48h. Cells were then treated with 5 µg/mL poly(I:C) or 20 µg/mL eRNA.

#### *RNA isolation, Reverse-Transcription and quantitative real-time PCR*

Gene expression was evaluated in murine endothelial cells, HUVECs and HEK293T by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Total RNA was extracted from cultured cells using a commercial kit following the manufacturer's instructions (Genaid, Froggabio and Nagel-Macherey). One µg of total RNA was reverse-transcribed as per the manufacturer's instructions (VWR and BioRad). The SYBRgreen intercalant was used for amplification detection with the Fast SYBRgreen master mix (Applied Biosystems and BioRad). Primers were designed using the Primer Express Software (Applied Biosystems). The TATA box binding protein (TBP) gene for human cells and S16 for murine cells were used for normalization. Fold change were calculated using the  $\Delta C_t$  method and results were expressed as fold change  $\pm$  SEM of five to seven independent experiments. Murine and human primer sequences are listed in Table I.

RNA used to treat HUVECs or HEK293T was isolated from HEK293T using a commercial kit following the manufacturer's instructions (Nagel-Macherey). RNA used to treat mice and murine endothelial cells was extracted from murine endothelial cells and 3T3 cells, respectively

#### *Western Blot*

HUVECs were lysed with 100 µL of whole cell lysis buffer (1% Igepal CA-630, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate and 1% Triton X-100) supplemented with 1 M dithiothreitol, 100 mM sodium orthovanadate and complete protease inhibitor cocktail (Roche). HEK293T were lysed with commercially available mammalian protein extraction reagent buffer (Fisher Scientific). Twenty-five µg of protein were separated by 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes (Fisher Scientific). Western blot analysis was performed with the following antibodies: rabbit anti-phospho-NF $\kappa$ B (1:1000, Cell Signaling), rabbit anti-NF $\kappa$ B (1:2000, Cell Signaling), anti-TLR3 (1:500, Thermo Fisher) and GAPDH (1:2000, Santa Cruz). Anti-rabbit coupled to HRP was used as secondary antibodies (1:2000, Dako). Signals were revealed by chemiluminescence (PerkinElmer) with the molecular imager chemidoc XRS system (Bio-Rad) and quantified by densitometry with Quantity one software (Bio-Rad).

### *ELISA*

CXCL5/LIX in culture media of WT and TLR3<sup>-/-</sup> endothelial cells were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturers' instructions (R&D Systems).

### *Migration assays*

Twenty-four-well plates and 8- $\mu$ m pore-size polyvinylpyrrolidone free polycarbonate membranes (VWR) were used. 700  $\mu$ L of conditioned media from HUVECs transfected with siRNA control or against TLR3 and incubated with poly(I:C) was added in the bottom chamber. Neutrophil suspension (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) was added to the top wells. EGM-2 was used as a negative control. The plate was incubated overnight at 37°C. Membranes were then removed, fixed, and stained using DAPI. The number of neutrophils that migrated to the lower side of the membrane was counted in 10 random microscope fields using the x20 objective (Leica). Neutrophils that passed through the membrane were quantified. When indicated migration was analyzed in presence of SB225002, CXCR2 antagonist (1 nM; Tocris).

### *Plasma clot formation*

HUVEC were seeded at a density of 100,000 cell per well in 96 well plate. The next day, cells were serum-starved (EBM-2) and stimulated overnight with 1 U/mL thrombin, 5  $\mu$ g/mL poly(I:C) or 20  $\mu$ g/mL eRNA. Re-calcified (10  $\mu$ M) plasma from healthy individuals was added to the wells and formation of fibrin was monitored by measuring OD at 405nm every 2 min for 2h. Curve analyses were done according to the ISTH SSC guidelines<sup>23</sup>.

### *Statistical analysis*

Data are presented as means  $\pm$  SEM from multiple independent experiments. Within-group differences were assessed by one-way analysis of variance followed by a post hoc Student-Newman-Keuls test. A value of P < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### *TLR3 is required for venous thrombosis induced by eRNA*

eRNA, derived from damaged or necrotic cells, constitute a natural pro-coagulant co-factor of arterial thrombosis<sup>15</sup>. The presence of eRNA in venous thrombus induced by FeCl<sub>3</sub> was assessed by the injection of SYTO RNASelect. eRNA were detected within the thrombus of WT mice (Figure 1A). To evaluate the role of eRNA in venous thrombosis, WT mice were treated with RNase1 prior to thrombosis induction. Thrombus size was significantly decreased by RNase1 treatment compared to vehicle (Figure 1B). Accumulation of monocytes and neutrophils within thrombi, as shown by MOMA-2 and Ly6G staining, was also reduced by RNase1 treatment (Figure 1C).

Next, we evaluated if direct activation of TLR3 promotes venous thrombosis. Injection of poly(I:C), TLR3 synthetic ligand, increased thrombus size in WT mice (Figure 2A). In addition, poly(I:C) enhanced the number of neutrophils and neutrophil extracellular trap (NET) formation within thrombi of WT mice (Figure 2B, C). Interestingly, these effects were blunted in TLR3<sup>-/-</sup> deficient mice.

To investigate the role of eRNA, WT and TLR3<sup>-/-</sup> mice received an injection of 10 µg of eRNA extracted from murine endothelial cells. Using high frequency ultrasound, we showed that injection of eRNA significantly increased thrombus size in WT mice. Interestingly, in TLR3<sup>-/-</sup> mice, treatment with eRNA did not induce further increase of thrombus size compared to vehicle (Figure 3A). Thrombus weight quantifications confirmed that injection of eRNA increased thrombus size in WT but not TLR3<sup>-/-</sup> mice (Figure 3B). In addition, eRNA increased neutrophil recruitment in WT but not TLR3<sup>-/-</sup> mice (Figure 3C).

### *eRNA induce CXCL5 expression in endothelial cells*

To identify the signals that coordinate the recruitment of neutrophils and favor their activation during venous thrombosis, HUVECs were treated with poly(I:C) in presence or absence of TLR3. HUVECs were transfected with a siRNA targeting TLR3 (siTLR3) or siRNA control (siCTR). TLR3 siRNA significantly reduced TLR3 expression in HUVECs. Interestingly, poly(I:C) treatment induced the expression of IL-8 and tissue factor (TF) in cells transfected with the siCTR. Downregulation of TLR3 in HUVEC significantly inhibited expression of these genes (Supplemental Figure I).

To determine if IL-8 produced by HUVECs after poly(I:C) incubation had a functional role on neutrophils, conditioned media from HUVECs transfected with siCTR or siTLR3 and treated with poly(I:C) were collected. The conditioned media was used to activate neutrophil migration in Boyden chambers. Neutrophil migration was increased following incubation with conditioned media from siCTR HUVEC stimulated with poly(I:C) compared to vehicle. Addition of an IL-8 receptor antagonist (SB225002) to the conditioned media significantly reduced neutrophil migration. Conditioned media from HUVECs transfected with siTLR3 with or without poly(I:C) or SB225002 did not alter neutrophil migration (Figure 4A).

Mice lack a direct homologue of IL-8 but CXCL1/KC and CXCL5-6/LIX are considered functional homologues of IL-8 and participate to neutrophil recruitment<sup>24</sup>. Furthermore, CXCL1 and



CXCL5 expression was found to be increased in mouse venous thrombi<sup>4</sup>. mRNA expression of CXCL1 was induced by poly(I:C) in WT but not TLR3<sup>-/-</sup> endothelial cells. However, eRNA did not induced CXCL1 production from WT or TLR3<sup>-/-</sup> endothelial cells (data not shown). Thus, we investigated if eRNA modified CXCL5 expression. Interestingly, we found that eRNA increased CXCL5 expression and secretion in WT endothelial cells. In endothelial cells deficient for TLR3, CXCL5 was not modified by eRNA treatment (Figure 4B-C).

#### *eRNA directly activate TLR3*

Signaling through TLR3 classically leads to NFκB and IRF-3 activation and expression of type I IFN genes and pro-inflammatory cytokine. To directly demonstrate that eRNA activate TLR3, HEK293T cells were transfected with an expression plasmid for human TLR3 and incubated with either poly(I:C) or eRNA. TLR3 protein and mRNA expression were significantly increased in cells transfected with the TLR3 plasmid (Figures 5A and 5B). Western blot analysis showed that both poly(I:C) and eRNA significantly increased NFκB phosphorylation only in cells transfected with the TLR3 plasmid (Figure 5C). In HEK293T overexpressing TLR3, NFκB activation induced by eRNA was associated with increased mRNA expression of interferon beta (IFNβ) (Figure 5D).

#### *eRNA induce coagulation and endothelial dysfunction through TLR3*

To determine if eRNA-dependent activation of endothelial TLR3 modulates the coagulation cascade, plasma clot formation experiments were done on HUVECs. Re-calcified plasma was added to HUVECs following treatment with poly(I:C) or eRNA. Fibrin formation was measured at 405nm for 2h. Poly(I:C) and eRNA treatment significantly increased turbidity change and area under the curve (AUC) suggesting an amplification of fibrin network formation (Figure 6A-B). In addition, maximum absorbance was significantly increased by eRNA treatment (Figure 6B). Importantly, these effects were associated with reduced expression of TFPI in endothelial cells treated with eRNA compared to control (Figure 6C).

## Discussion

In the present study, we demonstrate that eRNA promote venous thrombosis by activating TLR3 downstream signaling pathways in endothelial cells. This is illustrated by endothelial expression of a potent neutrophil chemoattractant cytokine, CXCL5 and down-regulation of TFPI expression correlated with a pro-coagulant phenotype.

eRNA derived from activated, stressed or injured cells under various pathological conditions such as hypoxia, infection, inflammation or tumor growth are detectable in body fluids. eRNA can be found within microvesicles or directly released from the damaged cell. These free eRNA act as alarmins by inducing pro-coagulant and pro-inflammatory responses<sup>25</sup>. Compelling evidence suggest an important role of eRNA in cardiovascular diseases. Hence, eRNA are natural pro-coagulant co-factor, promote tissue and vessel regeneration, increase vascular permeability, induce pro-inflammatory mediator release from vascular and inflammatory cells and trigger cell recruitment<sup>26</sup>. In arterial thrombosis, eRNA act as primary inducers/cofactors of contact phase coagulation proteins, including factors XII and XI, as well as prekallikrein and high-molecular weight kininogen through direct polyanionic interactions. Since VTE is an immuno-inflammatory disease and that eRNA promote leukocyte recruitment and cytokine secretion, we sought to investigate its role during venous thrombosis.

Here we show that eRNA are released during venous thrombosis induced after vessel injury and participate in the pro-coagulant response. Interestingly, treatment with RNase decreased neutrophil recruitment and NET formation, which may explain the reduced thrombus size. Hence, neutrophils promote venous thrombosis through the formation of NETs, composed of DNA, histones and cytoplasmic proteins released from cytoplasmic granules<sup>27</sup>. These NETs contribute to venous thrombosis by promoting platelet aggregation and thrombin formation by providing a scaffold for procoagulant molecules including vWF, fibronectin, fibrinogen, FXII and TF and contribute to anticoagulant factor cleavage (TFPI and thrombomodulin)<sup>28</sup>. Here, we provide evidence for eRNA-dependent neutrophil recruitment ultimately leading to NET formation.

Studies have suggested that TLR3 may have a role during thrombosis. Shibamiya et al. demonstrated that poly(I:C), a synthetic ligand of TLR3, upregulated TF and downregulated thrombomodulin expression in endothelial cells. In vivo, poly(I:C) elevated D-dimer levels, which suggested increased coagulation and fibrinolysis<sup>12</sup>. Other studies demonstrated that TLR3 activation in hypoxia models increased TF expression and activity, which suggest a pro-thrombotic role of TLR3. This effect was induced by poly(I:C) through TLR3<sup>29,30</sup>. Poly(I:C) also induced plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in human glomerular endothelial cells and this effect was abolished by the antimalarial agent chloroquine<sup>31</sup>. In addition, activation of TLR3 by poly(I:C) *in vivo* has been shown to impair endothelial function including vasodilation, ROS production and endothelial repair following injury<sup>11</sup>. In cancer, double-stranded RNA (dsRNA) released by disseminated tumor cells was detected by TLR3 causing endothelial SLIT2 induction, which promote cancer cell migration and intravasation toward endothelial cells<sup>32</sup>.

In contrast to the TLR3 detrimental effects mentioned above, studies have also elucidated beneficial roles of this receptor in pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis. Reduced expression of TLR3 contributes to endothelial apoptosis and pulmonary vascular remodeling leading to pulmonary hypertension<sup>33</sup>. Moreover, the TLR3 L412F polymorphism, which is characterized by defective TLR3 activation, is associated with aberrant fibroproliferation and accelerated progression of idiopathic pulmonary fibrosis<sup>34</sup>. Finally, in atherosclerosis, TLR3 has been shown to have protective effects in *in vivo* models of mechanical and hypercholesterolemic arterial injury<sup>35</sup>.

Here, we found that TLR3 activation induced by poly(I:C) increases venous thrombosis. This is partially explained by poly(I:C)-induced neutrophil accumulation in WT mice, compared to TLR3<sup>-/-</sup> mice. Contrary to our result, Suresh et al. showed that TLR3 deficiency favors neutrophil recruitment, conferring a protective role during pulmonary infection<sup>36</sup>. This discrepancy could be explained by pathological differences and cellular type. Imhof et al. described that TLR3, with TLR4, exhibits early neutrophil arrival followed by late and weak monocyte recruitment. This study corroborates our data showing that TLR3 activation fosters neutrophil recruitment<sup>37</sup>.

Reports suggest that short RNA sequences are sufficient to stimulate TLR3<sup>9</sup>. We showed that eRNA increase thrombus size and neutrophil recruitment through endothelial TLR3. Although we did not identify the source and the nature of the RNA in our *in vivo* model of venous thrombosis, our work corroborates that eRNA or self-RNA are indeed ligands of TLR3. Hence, our *in vitro* work demonstrates that eRNA-dependent NF $\kappa$ B phosphorylation and IFN $\beta$  upregulation require TLR3 in HEK293T cells. Additional studies have suggested that eRNA are mediating their effects through TLR3<sup>13,30,38-40</sup>. For example, in myocardial infarction, eRNA released from damaged tissue were found to activate the TLR3-TRIF pathway<sup>14</sup>. Here, we found that eRNA induced classical target gene of TLR3, IFN $\beta$ , in HEK293T cells overexpressing TLR3.

Since human neutrophils do not express TLR3, we sought to investigate how eRNA may promote neutrophil recruitment and activation<sup>40</sup>. TLR3 and eRNA independently induce the release of pro-inflammatory cytokines in cardiovascular diseases<sup>41</sup>. Here, we found that poly(I:C) mediates IL-8 expression, which is a strong chemoattractant for neutrophils, in human endothelial cells. Downregulation of TLR3 expression using siRNA leads to a reduced IL-8 secretion from endothelial cells. Low level of IL-8 was associated with reduced neutrophil migration *in vitro*. CXCL1, CXCL5 and CXCL6 are considered as IL-8 homologues in mice. We found that secretion of CXCL5 from murine endothelial cells was induced by eRNA in a TLR3-dependent manner *in vitro*. Although we did not confirm the role of CXCL5 *in vivo*, one can speculate that CXCL5 is released from cytoplasmic granules of endothelial cells and platelets upon cell activation during thrombosis<sup>24</sup>.

Importantly, TLR3 and thrombin receptors, PAR1/2, were found to cooperate in the expression of pro-inflammatory and pro-thrombotic genes in endothelial cells<sup>42</sup>. Hence, we showed that eRNA-dependent activation of TLR3 is associated with increased coagulability of endothelial cells. Turbidity experiments demonstrated that treatment of HUVEC with poly(I:C) or eRNA enhanced fibrin formation

in normal plasma. We showed that eRNA decreased TFPI expression<sup>42</sup>. Interestingly, it has been shown that NFκB activation was associated with reduced TFPI expression in HUVECs<sup>43</sup>. This mechanism may also be involved in our experimental conditions. Although we did not test it directly, we think that eRNA regulates TFPI expression through TLR3/NFκB activation.

As it has been reported in previous studies, the role of TLR3 as a receptor for eRNA is still under debate and appears to be minor in mediating eRNA-cytokine responses in the context of arterial diseases<sup>26</sup>. However, in the venous system, eRNA induce mechanisms relevant for VTE through TLR3. We believe that these apparent discrepancies with our study may be due to different cell type and vascular beds but also the chemokines or cytokines studied. We found that eRNA act through TLR3 to induce CXCL5 expression. In addition, we acknowledge that this mechanism would require more thorough investigation *in vivo*. However, we clearly demonstrated that eRNA promote venous thrombosis through neutrophil recruitment and modulation of endothelial pro-coagulant activity in TLR3-dependent manner. Our study provides important evidence regarding the role of endogenous eRNA in the induction of pro-coagulant pathways in endothelial cells over the course of venous thromboembolism.

For ATVB Peer Review. Do not distribute after use.

### **Author contributions**

M. Najem and R. N. Rys performed research, analyzed data and wrote the manuscript. S. Laurance, F-R. Bertin V. Gourdou-Latyszenok, L. Gourhant and R. Le Corre performed research and analyzed data. M. D. Blostein and F. Couturaud interpreted the data and wrote the manuscript. C. A. Lemarié conceived and supervised the study, performed research, analyzed data and wrote the manuscript.

### **Acknowledgment**

This study was supported by The Morris and Bella Fainman Family Foundation. C.L. was supported by Région Bretagne, Département du Finistère and Brest Métropole. C.A.L. also received funding from the “Fédération Française de Cardiologie”.

### **Disclosures**

The authors have no conflict of interest.

For ATVB Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

## References

1. Fowkes, F. J., Price, J. F. & Fowkes, F. G. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **25**, 1–5 (2003).
2. Kahn, S. R. *et al.* Determinants and time course of the postthrombotic syndrome after acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* **149**, 698–707 (2008).
3. Mehta, S. *et al.* Diagnostic Evaluation and Management of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: A Clinical Practice Guideline. *Canadian Respiratory Journal* **17**, 301–334 (2010).
4. von Bruhl, M. L. *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* **209**, 819–835 (2012).
5. Wagner, D. D. New links between inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1321–4 (2005).
6. Fuchs, T. A., Brill, A. & Wagner, D. D. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 1777–83 (2012).
7. Brill, A. *et al.* Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* **10**, 136–44 (2012).
8. Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. & Weissman, D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* **279**, 12542–50 (2004).
9. Kleinman, M. E. *et al.* Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* **452**, 591–7 (2008).
10. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–8 (2001).
11. Zimmer, S. *et al.* Activation of endothelial toll-like receptor 3 impairs endothelial function. *Circ Res* **108**, 1358–66 (2011).
12. Shibamiya, A. *et al.* A key role for Toll-like receptor-3 in disrupting the hemostasis balance on endothelial cells. *Blood* **113**, 714–22 (2009).
13. Cavassani, K. A. *et al.* TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med* **205**, 2609–21 (2008).
14. Chen, C. *et al.* Role of extracellular RNA and TLR3-Trif signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American Heart Association* **3**, e000683 (2014).
15. Kannemeier, C. *et al.* Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6388–93 (2007).
16. Fischer, S. *et al.* Extracellular RNA promotes leukocyte recruitment in the vascular system by mobilising proinflammatory cytokines. *Thromb Haemost* **108**, (2012).
17. Simsekylmaz, S. *et al.* Role of extracellular RNA in atherosclerotic plaque formation in mice. *Circulation* **129**, 598–606 (2014).
18. Walberer, M. *et al.* RNase therapy assessed by magnetic resonance imaging reduces cerebral edema and infarction size in acute stroke. *Current neurovascular research* **6**, 12–9 (2009).
19. Robins, R. S. *et al.* Vascular Gas6 contributes to thrombogenesis and promotes tissue factor up-regulation after vessel injury in mice. *Blood* **121**, 692–9 (2013).
20. Aghourian, M. N., Lemarie, C. A. & Blostein, M. D. In vivo monitoring of venous thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* **10**, 447–52 (2012).
21. Aghourian, M. N., Lemarie, C. A., Bertin, F. R. & Blostein, M. D. Prostaglandin E synthase is upregulated by Gas6 during cancer-induced venous thrombosis. *Blood* **127**, 769–777 (2016).
22. Bertin, F. R., Lemarie, C. A., Robins, R. S. & Blostein, M. D. Gas6 regulates thrombin-induced expression of VCAM-1 through FoxO-1 in endothelial cells. *J Thromb Haemost* (2015) doi:10.1111/jth.13156.

23. Pieters, M. *et al.* An international study on the feasibility of a standardized combined plasma clot turbidity and lysis assay: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **16**, 1007–1012 (2018).
24. Hol, J., Wilhelmsen, L. & Haraldsen, G. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *J Leukoc Biol* **87**, 501–8 (2010).
25. Preissner, K. T., Fischer, S. & Deindl, E. Extracellular RNA as a Versatile DAMP and Alarm Signal That Influences Leukocyte Recruitment in Inflammation and Infection. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, 1618 (2020).
26. Zerneck, A. & Preissner, K. T. Extracellular Ribonucleic Acids (RNA) Enter the Stage in Cardiovascular Disease. *Circ Res* **118**, 469–79 (2016).
27. Rohrbach, A. S., Slade, D. J., Thompson, P. R. & Mowen, K. A. Activation of PAD4 in NET formation. *Frontiers in immunology* **3**, 360 (2012).
28. Thålin, C., Hisada, Y., Lundström, S., Mackman, N. & Wallén, H. Neutrophil Extracellular Traps. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **39**, 1724–1738 (2019).
29. Biswas, I., Garg, I., Singh, B. & Khan, G. A. A key role of toll-like receptor 3 in tissue factor activation through extracellular signal regulated kinase 1/2 pathway in a murine hypoxia model. *Blood Cells Mol Dis* **49**, 92–101 (2012).
30. Bhagat, S., Biswas, I., Ahmed, R. & Khan, G. A. Hypoxia induced up-regulation of tissue factor is mediated through extracellular RNA activated Toll-like receptor 3-activated protein 1 signalling. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **84**, 102459 (2020).
31. Aizawa, T. *et al.* Chloroquine attenuates TLR3-mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression in cultured human glomerular endothelial cells. *Clin Exp Nephrol* **23**, 448–454 (2019).
32. Tavora, B. *et al.* Tumoural activation of TLR3-SLIT2 axis in endothelium drives metastasis. *Nature* **586**, 299–304 (2020).
33. Farkas, D. *et al.* Toll-like Receptor 3 Is a Therapeutic Target for Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **199**, 199–210 (2019).
34. O'Dwyer, D. N., Armstrong, M. E., Kooblall, M. & Donnelly, S. C. Targeting defective Toll-like receptor-3 function and idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **19**, 507–514 (2015).
35. Cole, J. E. *et al.* Unexpected protective role for Toll-like receptor 3 in the arterial wall. *PNAS* **108**, 2372–2377 (2011).
36. Suresh, M. V. *et al.* TLR3 absence confers increased survival with improved macrophage activity against pneumonia. *JCI Insight* **4**, (2019).
37. Imhof, B. A., Jemelin, S. & Emre, Y. Toll-like receptors elicit different recruitment kinetics of monocytes and neutrophils in mouse acute inflammation. *European Journal of Immunology* **47**, 1002–1008 (2017).
38. Bernard, J. J. *et al.* Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med* (2012) doi:10.1038/nm.2861.
39. Green, N. M., Moody, K.-S., Debatis, M. & Marshak-Rothstein, A. Activation of Autoreactive B Cells by Endogenous TLR7 and TLR3 RNA Ligands\*. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 39789–39799 (2012).
40. Jenne, C. N. *et al.* Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* **13**, 169–80 (2013).
41. Preissner, K. T. & Herwald, H. Extracellular nucleic acids in immunity and cardiovascular responses: between alert and disease. *Thromb Haemost* **117**, 1272–1282 (2017).

42. Subramaniam, S. *et al.* A thrombin-PAR1/2 feedback loop amplifies thromboinflammatory endothelial responses to the viral RNA analogue poly(I:C). *Blood Advances* **5**, 2760–2774 (2021).
43. Chen, Y. *et al.* CRP regulates the expression and activity of tissue factor as well as tissue factor pathway inhibitor via NF- $\kappa$ B and ERK 1/2 MAPK pathway. *FEBS Letters* **583**, 2811–2818 (2009).

### Figure Legends

**Figure 1. Extracellular RNA promote venous thrombosis.** (A) Extracellular RNA (eRNA) is present within thrombi after vascular injury following FeCl<sub>3</sub>. (B) RNase I treatment reduces thrombus size in mice after vascular injury. (C) Treatment with RNase I is associated with reduced leukocyte infiltration as shown by MOMA-2 staining for monocyte/macrophage (Bar=5  $\mu$ m) and Ly6G staining for neutrophils (Bar=50 $\mu$ m, N=6, \*P<0.05).

**Figure 2. Activation of TLR3 promotes venous thrombosis.** (A) Injection of poly(I:C) increased thrombus size in WT but not TLR3<sup>-/-</sup> mice (Bar=50  $\mu$ m; N=5-9). (B) Poly(I:C) treatment increased infiltration of neutrophils within thrombi of WT but not TLR3<sup>-/-</sup> mice (Bar=50  $\mu$ m; N=5-9). (C) Poly(I:C) induced the formation of NETs within thrombi of WT but not TLR3<sup>-/-</sup> mice (Bar=5  $\mu$ m; N=4-6) \*P<0.05 or \*\*P<0.01 WT vehicle vs WT poly(I:C), #P<0.05 or ###P<0.01 WT poly(I:C) vs TLR3<sup>-/-</sup> poly(I:C).

**Figure 3. eRNA increase venous thrombosis.** (A) Injection of eRNA to WT mice increased thrombus cross sectional area measured using ultrasonography. eRNA increased thrombus size in WT mice. However, eRNA did not affect thrombus size in TLR3<sup>-/-</sup> mice (N=7-9). (B) eRNA increased thrombus weight in WT but not in TLR3<sup>-/-</sup> mice (N=6-7). (C) eRNA increased the infiltration of neutrophils (Bar=50  $\mu$ m; N=4). \*P<0.05 WT vehicle vs WT eRNA, #P<0.05 or ###P<0.001 WT eRNA vs TLR3<sup>-/-</sup> eRNA.

**Figure 4. TLR3 activation promotes neutrophil migration and CXCL5 expression from endothelial cells.** (A) Conditioned media from HUVECs treated with poly(I:C) induced neutrophil migration. This effect is dependent on CXCR2. On the contrary, conditioned media from HUVEC deficient for TLR3 did not modify the migratory capacity of neutrophils (N=4). (B) In murine endothelial cells, mRNA (N=5-6) and (C) protein (N=4) expression of CXCL5 is induced by eRNA and required the presence of TLR3. \*\*P<0.01 vehicle vs treatment in HUVEC transfected with control siRNA; ###P<0.01 vehicle vs treatment in HUVEC transfected with TLR3 siRNA and §P<0.05 siCTR poly(I:C) vs siCTR poly(I:C) + SB225002. \*\*\*P<0.001 WT vehicle vs WT eRNA; ###P<0.01 WT eRNA vs TLR3<sup>-/-</sup> eRNA and \*P<0.05 WT vehicle vs WT treated.

**Figure 5. eRNA induce intracellular signaling pathways through TLR3.** (A) Transfection of HEK293T cells with an expression plasmid for human TLR3 significantly increased TLR3 protein expression compared to cells transfected with an empty vector (N=3). (B) TLR3 mRNA is also significantly expressed after incubation poly(I:C) and eRNA in HEK293T over-expressing TLR3 compared to vehicle. (C) Incubation of eRNA with HEK293T cells over-expressing TLR3 significantly increased phosphorylation of NF $\kappa$ B. (D) This is associated with higher expression of TLR3 target gene IFN $\beta$  compared to unstimulated cells. \*P<0.05 vehicle vs eRNA in HEK293T cells over-expressing TLR3,



\*\*\*P<0.001 vehicle vs treatment in HEK293T cells over-expressing TLR3 and #P<0.05 empty vector vs TLR3 expression plasmid for equivalent treatment.

**Figure 6. eRNA trigger clotting through TFPI regulation.** (A) Representative curve of clot formation assays on HUVEC monolayer. After incubation of HUVECs with eRNA or poly(I:C), clot formation was triggered in plasmas from healthy individuals by recalcification. Clot formation was monitored by turbidity. (B) eRNA significantly increased maximum absorbance (i, N=7) but the slope which represents the rate of fibrin formation was unchanged (ii, N=7). Interestingly, both eRNA and poly(I:C) significantly increased the area under the curve (AUC) (iii, N=10). (C) eRNA significantly reduced TFPI mRNA expression (N=8). \*P<0.05 or \*\*P<0.01 vehicle vs treatment.

**Supplemental Figure I. TLR3 is required for gene expression in endothelial cells.** mRNA expression of TLR3, IL-8 and TF in HUVEC transfected with an siRNA control or targeting TLR3. Poly(I:C) significantly enhanced expression of these genes in a TLR3-dependent manner (N=5). \*P<0.05, \*\*P<0.01 or \*\*\*P<0.001 vehicle vs treatment in HUVEC transfected with control siRNA, #P<0.05 or ##P<0.01 vehicle vs treatment in HUVEC transfected with TLR3 siRNA.

For ATVB Peer Review. Do not distribute outside of ATVB after use.

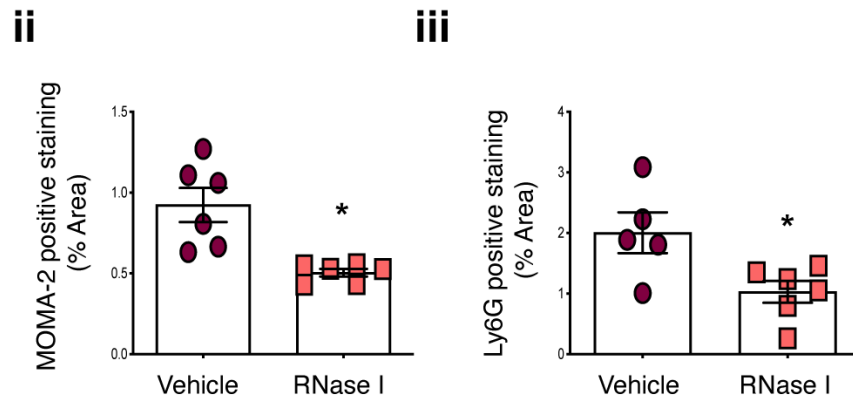
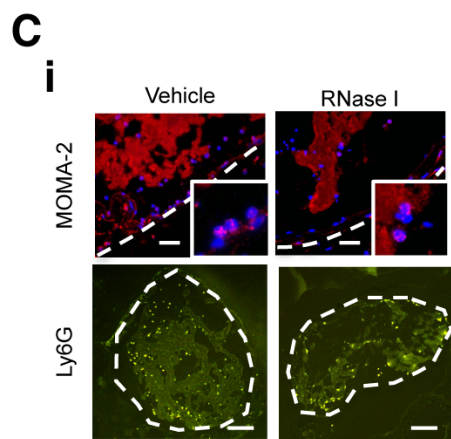
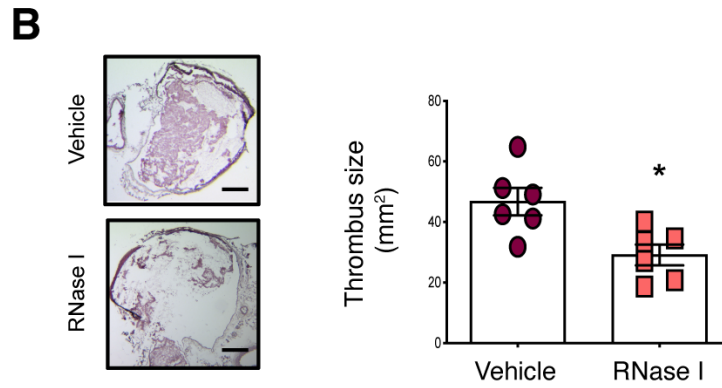
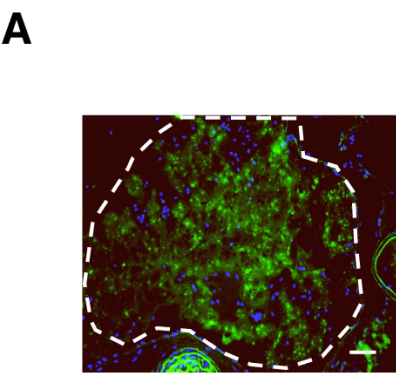


Figure 1. Extracellular RNA promote venous thrombosis. (A) Extracellular RNA (eRNA) is present within thrombi after vascular injury following FeCl<sub>3</sub>. (B) RNase I treatment reduces thrombus size in mice after vascular injury. (C) Treatment with RNase I is associated with reduced leukocyte infiltration as shown by MOMA-2 staining for monocyte/macrophage (Bar=5 μm) and Ly6G staining for neutrophils (Bar=50 μm, N=6, \*P<0.05).

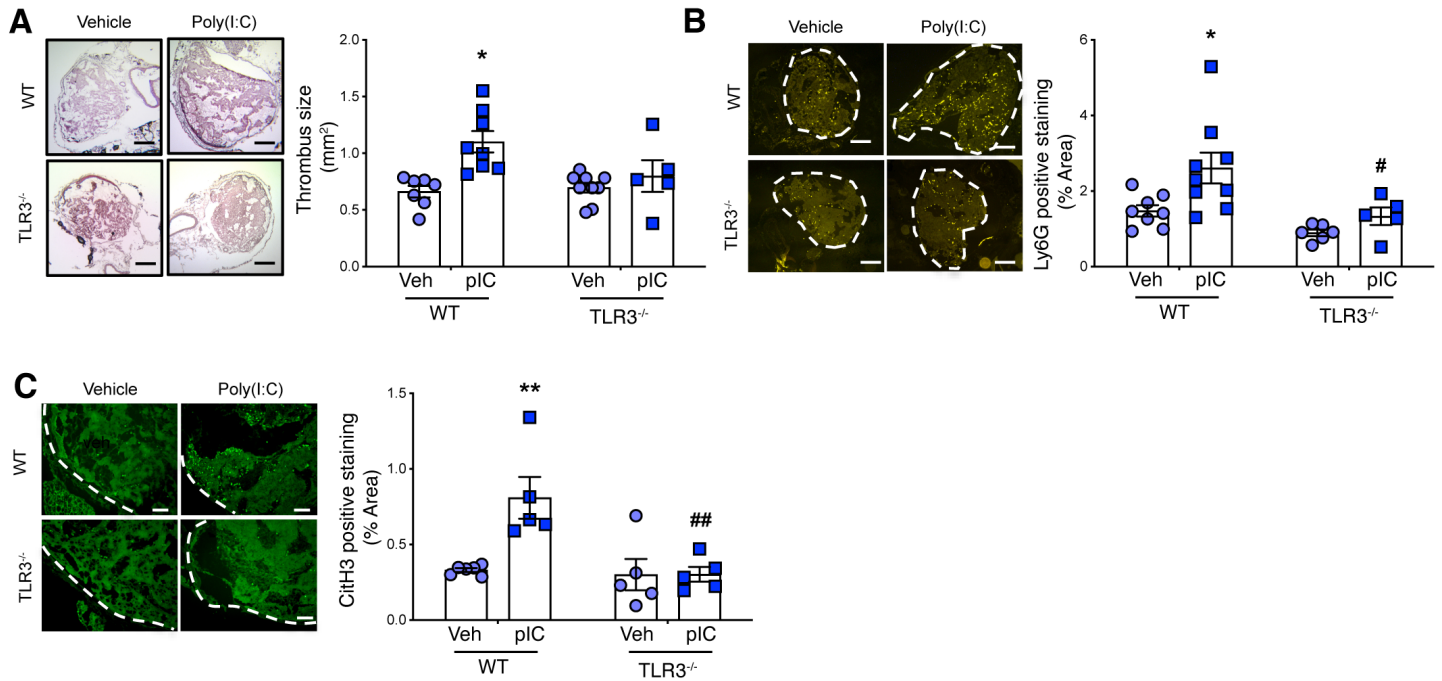


Figure 2. Activation of TLR3 promotes venous thrombosis. (A) Injection of poly(I:C) increased thrombus size in WT but not TLR3<sup>-/-</sup> mice (Bar=50  $\mu$ m; N=5-9). (B) Poly(I:C) treatment increased infiltration of neutrophils within thrombi of WT but not TLR3<sup>-/-</sup> mice (Bar=50  $\mu$ m; N=5-9). (C) Poly(I:C) induced the formation of NETs within thrombi of WT but not TLR3<sup>-/-</sup> mice (Bar=5  $\mu$ m; N=4-6) \*P<0.05 or \*\*P<0.01 WT vehicle vs WT poly(I:C), #P<0.05 or ##P<0.01 WT poly(I:C) vs TLR3<sup>-/-</sup> poly(I:C).

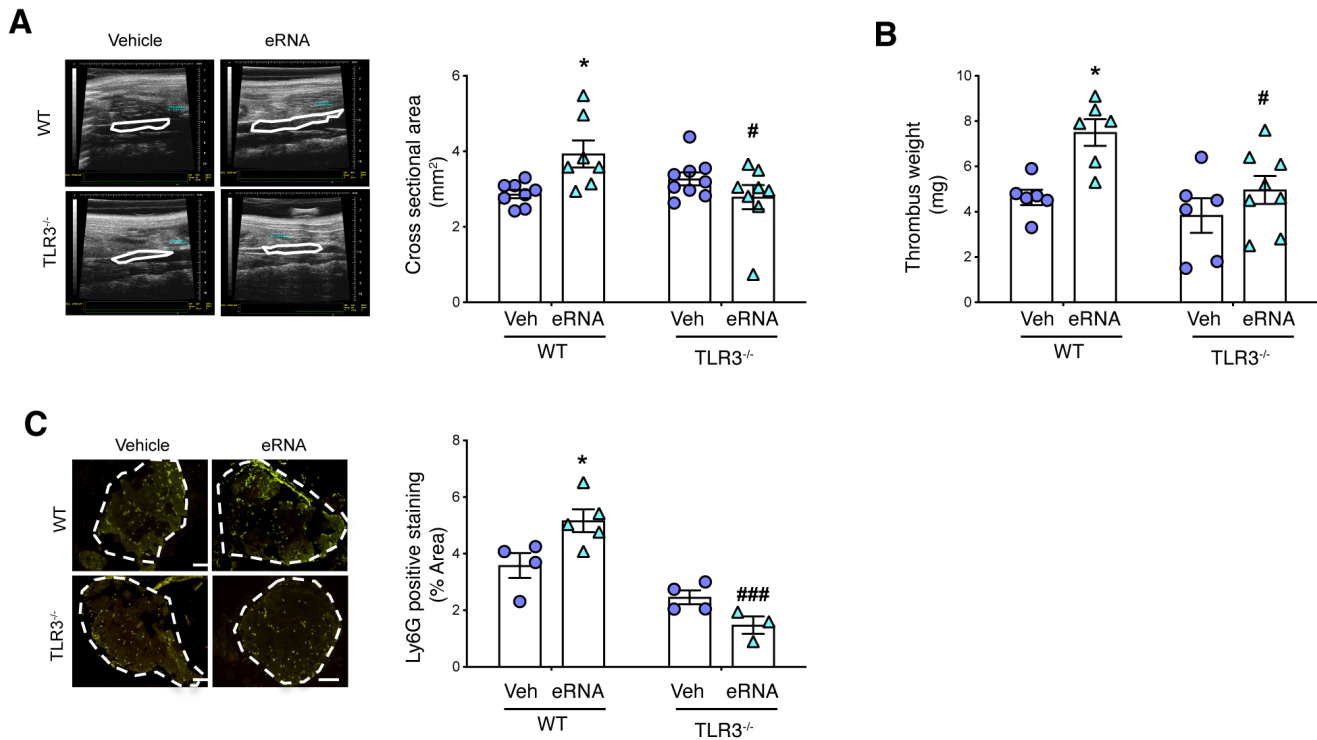


Figure 3. eRNA increase venous thrombosis. (A) Injection of eRNA to WT mice increased thrombus cross sectional area measured using ultrasonography. eRNA increased thrombus size in WT mice. However, eRNA did not affect thrombus size in TLR3<sup>-/-</sup> mice (N=7-9). (B) eRNA increased thrombus weight in WT but not in TLR3<sup>-/-</sup> mice (N=6-7). (C) eRNA increased the infiltration of neutrophils (Bar=50  $\mu$ m; N=4). \*P<0.05 WT vehicle vs WT eRNA, #P<0.05 or ###P<0.001 WT eRNA vs TLR3<sup>-/-</sup> eRNA.

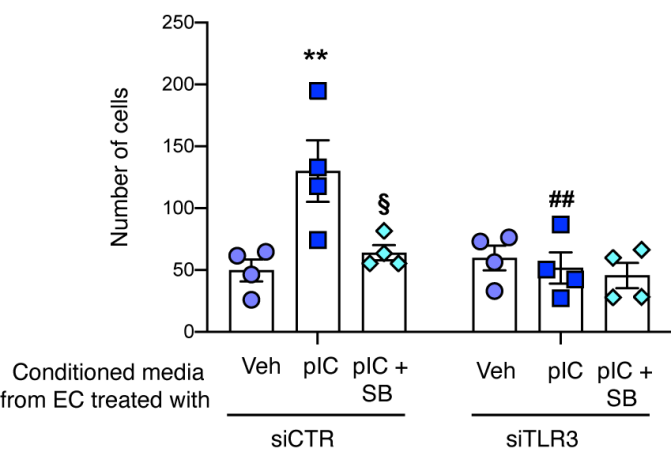
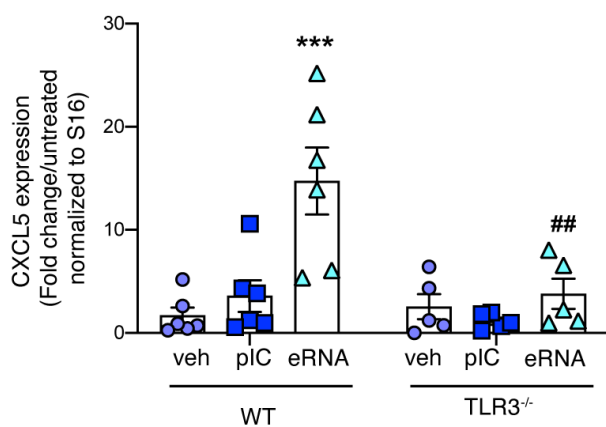
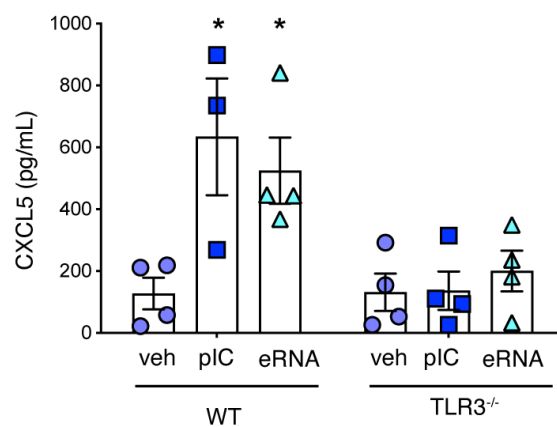
**A****B****C**

Figure 4. TLR3 activation promotes neutrophil migration and CXCL5 expression in endothelial cells.

(A) Conditioned media from HUVEC treated with poly(I:C) induced neutrophil migration. This effect is dependent on CXCR2. On the contrary, conditioned media from HUVEC deficient for TLR3 did not modify the migratory capacity of neutrophils (N=4). (B) In murine endothelial cells, mRNA (N=5-6) and (C) protein (N=4) expression of CXCL5 is induced by eRNA and required the presence of TLR3. \*\*P<0.01 vehicle vs treatment in HUVEC transfected with control siRNA; ##P<0.01 vehicle vs treatment in HUVEC transfected with TLR3 siRNA and §P<0.05 siCTR poly(I:C) vs siCTR poly(I:C) + SB225002. \*\*\*P<0.001 WT vehicle vs WT eRNA; ##P<0.01 WT eRNA vs TLR3<sup>-/-</sup> eRNA and \*P<0.05 WT vehicle vs WT treated.

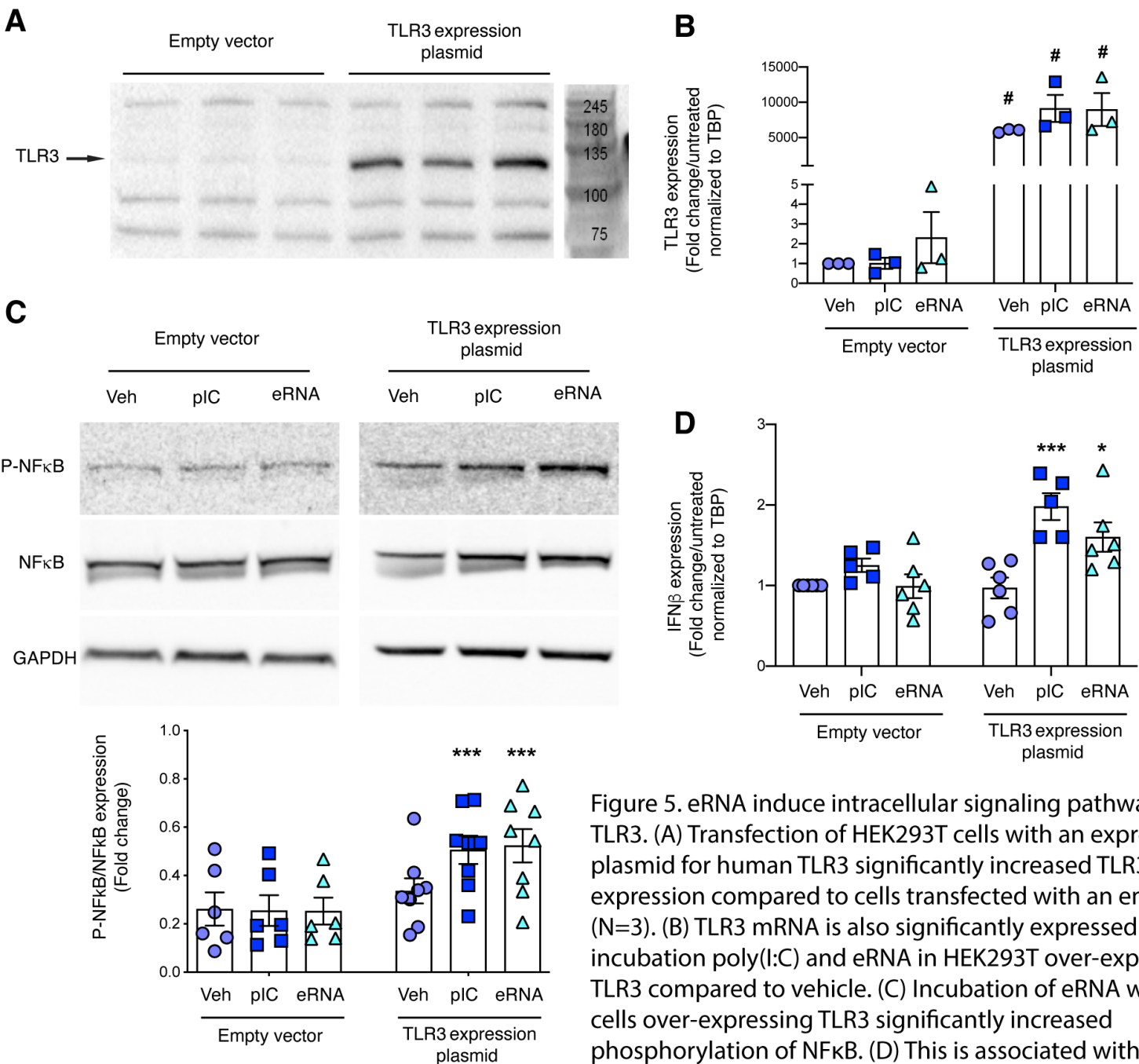


Figure 5. eRNA induce intracellular signaling pathways through TLR3. (A) Transfection of HEK293T cells with an expression plasmid for human TLR3 significantly increased TLR3 protein expression compared to cells transfected with an empty vector (N=3). (B) TLR3 mRNA is also significantly expressed after incubation poly(I:C) and eRNA in HEK293T over-expressing TLR3 compared to vehicle. (C) Incubation of eRNA with HEK293T cells over-expressing TLR3 significantly increased phosphorylation of NFκB. (D) This is associated with higher expression of TLR3 target gene IFNβ compared to unstimulated cells. \*P<0.05 vehicle vs eRNA in HEK293T cells over-expressing TLR3, \*\*\*P<0.001 vehicle vs treatment in HEK293T cells over-expressing TLR3 and #P<0.05 empty vector vs TLR3 expression plasmid for equivalent treatment.

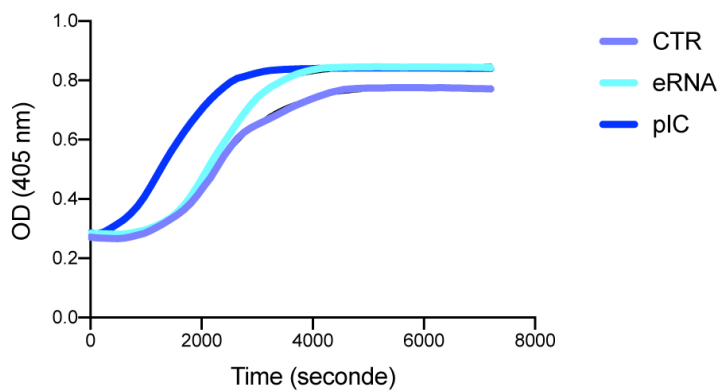
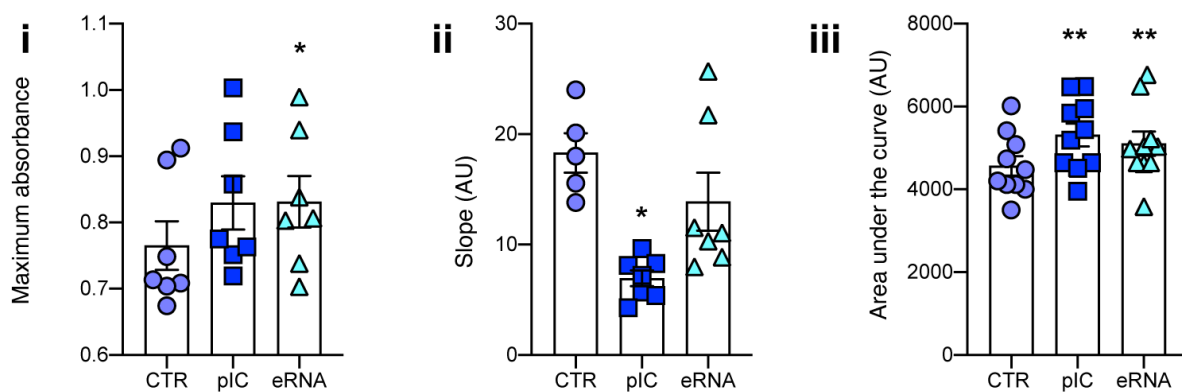
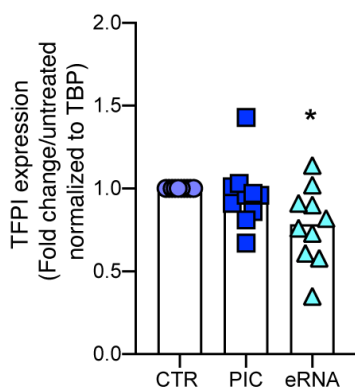
**A****B****C**

Figure 6. eRNA trigger clotting through TFPI regulation. (A) Representative curve of clot formation assays on HUVEC monolayer. After incubation of HUVECs with eRNA or poly(I:C), clot formation was triggered in plasmas from healthy individuals by recalcification. Clot formation was monitored by turbidity. (B) eRNA significantly increased maximum absorbance (i, N=7) but the slope which represents the rate of fibrin formation was unchanged (ii, N=7). Interestingly, both eRNA and poly(I:C) significantly increased the area under the curve (AUC) (iii, N=10). (C) eRNA significantly reduced TFPI mRNA expression (N=8). \*P<0.05 or \*\*P<0.01 vehicle vs treatment.

## **VI.2. Article 2 en cours de préparation**

### **VI.2.1. Présentation de l'article 2**

La MVTE est une pathologie multifactorielle caractérisée par une interdépendance du système immunitaire et de la coagulation. Comme révélée dans l'introduction, l'immunité innée joue un rôle central dans la thrombogenèse. En effet, les monocytes et les neutrophiles coopèrent dans l'initiation et la progression de la MVTE via l'expression du FT et la NETose. D'autres cellules immunitaires innées participent également à la phase aiguë de la MVTE, telles que les macrophages, les mastocytes et les cellules NK. Cependant, le système immunitaire inné ne pourrait pas à lui seul expliquer les complications chroniques de la MVTE, comme le SPT, l'HTP-TEC et la récurrence. Une méta-analyse a indiqué que le risque de récurrence de la MVTE chez les patients dont le premier événement est non provoqué, est de l'ordre de 10%, 25% et 36% à 1, 5 et 10 ans après l'arrêt du traitement, respectivement (272). D'où, l'importance de caractériser le rôle de l'immunité adaptative qui pourrait contribuer à la chronicité de la MVTE. Jusqu'à présent, quelques travaux de recherche ont évalué le rôle des lymphocytes T et B dans le premier événement de MVTE. L'équipe de Christian Becker a démontré que les cellules T mémoires effectrices  $T_{EM}$  exercent une activité prothrombotique en orchestrant le recrutement des monocytes et des neutrophiles et en retardant la résorption du thrombus. Ces effets semblent être médiés par la cytokine pro-inflammatoire  $IFN-\gamma$ , sécrétée par les cellules  $T_{EM}$  indépendamment d'une activation antigénique (181). Cette même équipe a également identifié un nouveau sous-type de lymphocytes T au niveau du thrombus veineux, les cellules  $SPARC^+$  Tregs. Ces dernières accélèrent la résorption du thrombus en augmentant le nombre de monocytes et l'activité de leurs MMPs, via la production de la protéine matricellulaire SPARC (206). D'autre part, Mukhopadhyay et al. ont constaté que l'activité anti-thrombotique des lymphocytes T  $CD4^+$  et T  $CD8^+$  est associée à une augmentation d'infiltration des macrophages, d'expression protéique d'uPA et de l'activité gélatinolytique de MMP-9 (205). Quant aux lymphocytes B, ils semblent intervenir dans la résorption du thrombus. Les résultats préliminaires de Frey et al. montrent que l'infusion de splénocytes ou de lymphocytes B spléniques aux souris splénectomisées réduit la taille du thrombus (17).

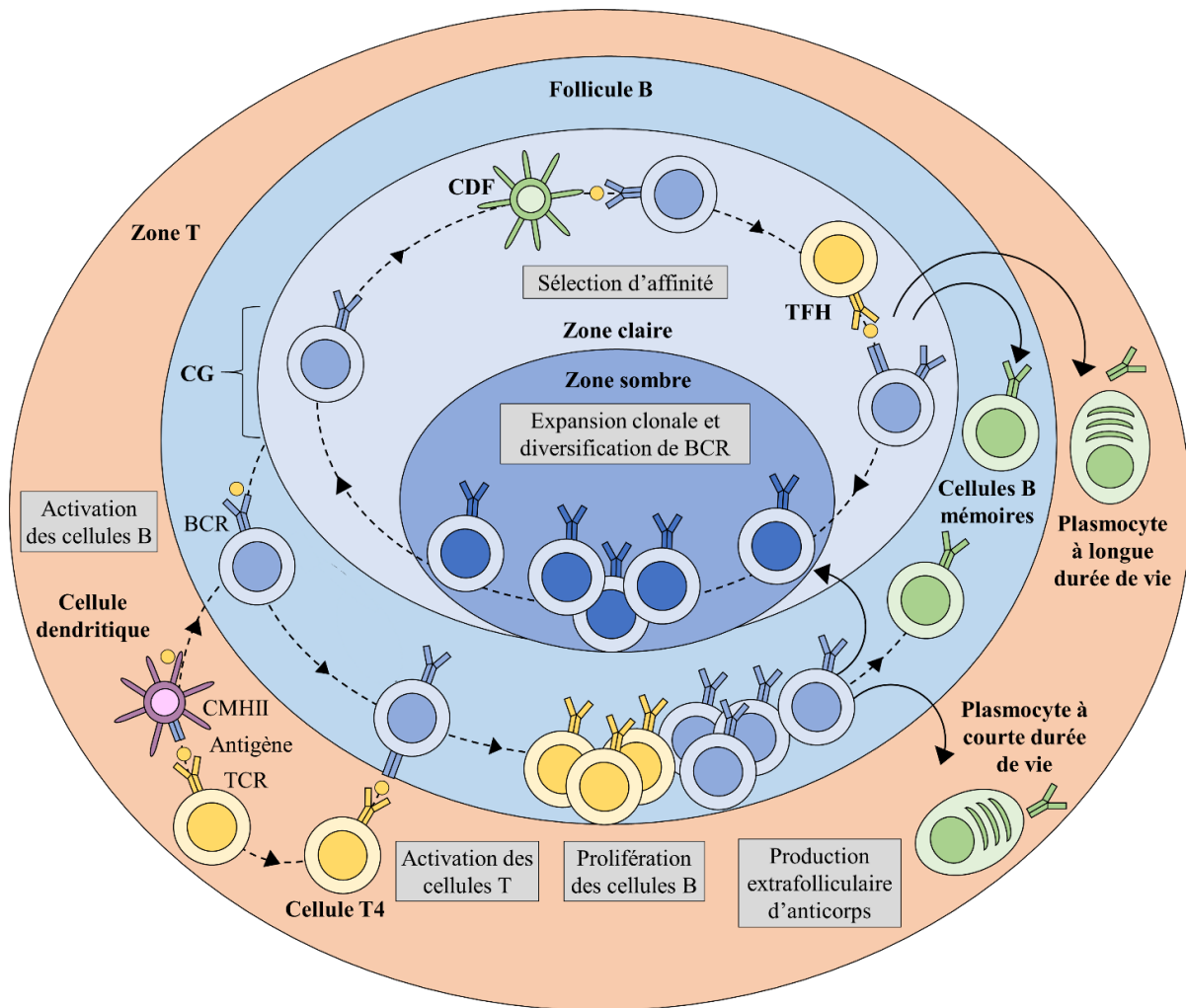
Étant donné que les travaux de recherche étudiant l'implication de l'immunité adaptative dans la MVTE sont limités, j'ai mis en place un nouveau projet visant à analyser différents sous-types de lymphocytes T et B au cours du temps, en passant de la phase aiguë à la phase chronique. Ce projet consiste à induire la thrombose à des souris témoins en utilisant le modèle



de stase veineuse et à caractériser les populations immunitaires à différents temps par cytométrie en flux et immunofluorescence. Ce travail permettra d'identifier plusieurs types de lymphocytes T et B au niveau de la rate, du sang, de la paroi veineuse et de la moelle osseuse en fonction du temps suite à la thrombose veineuse. J'ai choisi de réaliser une cinétique de 2, 7, 14, 21 et 28 jours. En utilisant ce modèle, le thrombus atteint sa taille maximale à J2 et se résorbe presque totalement à J28.

Les lymphocytes B jouent un rôle clé dans les maladies vasculaires, notamment dans l'athérosclérose. Les lymphocytes B1 résident principalement dans la cavité péritonéale et sont subdivisés en B1a et B1b. Les lymphocytes B1a ont été identifiés comme athéroprotecteurs via la production d'IgM dirigées contre les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les cellules apoptotiques, favorisant ainsi leur élimination. En revanche, les lymphocytes B2 comprenant les cellules B folliculaires (FO) et celles de la zone marginale (ZM) exercent un rôle athérogène en sécrétant des IgG et des IgE (211). De leur côté, les cellules Breg produisant la cytokine anti-inflammatoire IL-10 n'altèrent pas l'athérogenèse (273). Afin de déterminer les sous-types de lymphocytes B prothrombotiques et antithrombotiques, j'analyserai les cellules B1, B2, Breg, B mémoires et les plasmocytes. Concernant les lymphocytes T, l'équipe de Christian Becker a déjà réalisé une cinétique de 2, 7, 14 et 21 jours pour analyser les cellules T et Treg au niveau de la rate, du sang, du thrombus et de la paroi veineuse (181) (206). Cependant, cette équipe a utilisé le modèle de sténose où la taille de thrombus est moins reproductible que la stase. Comparé aux travaux de Becker, j'ai ajouté un temps supplémentaire de 28 jours pour étudier la réponse chronique et je m'intéresserai non seulement aux cellules CD4<sup>+</sup> Treg, mais aussi aux cellules CD8<sup>+</sup> Treg.

Ce projet s'inscrit donc dans la continuité de mon travail de recherche principal portant sur la contribution du TLR3 à la MVTE. En effet, mon premier article a déterminé le rôle du TLR3 dans la phase aiguë de la MVTE alors que ce projet me permettra d'élucider son rôle dans la phase chronique. En effet, les mécanismes pro-inflammatoires induits par le TLR3 et d'autres composants du système immunitaire inné pourraient contribuer à une inflammation persistante dans le temps, qui sera à l'origine de l'activation du système immunitaire adaptatif.



**Figure 19 : Génération des cellules B mémoires et des plasmocytes.** Suite à une stimulation antigénique de type T-dépendant, les cellules B migrent à l'extérieur des follicules, où elles prolifèrent. Une partie des cellules B se différencient en plasmocytes à courte durée de vie qui sont à l'origine des foyers extrafolliculaires, ou en cellules B mémoires indépendantes du centre germinatif. Alternativement, les cellules B activées rentrent au sein des follicules et subissent une prolifération rapide pour former le centre germinatif. Dans la zone sombre, l'expansion clonale des cellules B spécifiques de l'antigène s'accompagne d'une diversification de BCRs par hypermutation somatique. Dans la zone claire, la sélection d'affinité se produit par interaction avec les cellules dendritiques folliculaires (CDF) et les cellules auxiliaires folliculaires (TFH). Les lymphocytes B de forte affinité quittent le centre germinatif et se différencient en cellules B mémoires ou en plasmocytes à longue durée de vie. Figure adaptée de Kurosaki et al. *Nature Reviews Immunology* **2015** (274).

## **VI.2.2. Matériels et méthodes de l'article 2**

### **VI.2.2.1. Modèle murin de stase veineuse**

La thrombose veineuse est induite par la ligature complète de la veine cave inférieure conduisant à la stase. La peau de l'abdomen et la paroi musculaire sont incisées sur 1,5 cm à gauche de la ligne médiane, puis sur 1cm sur le bas de l'abdomen. Le tube digestif est posé du côté gauche de la souris entre deux compresses humidifiées avec une solution saline stérile à 37°C. La veine cave inférieure est dégagée du tissu environnant entre les veines iliaques et rénales avec des bâtonnets ouatés humides et des pinces fines. Les veines collatérales et la veine cave inférieure sont ligaturées à l'aide de fil de suture en prolène 7/0. Après avoir vérifié l'absence de saignement, les intestins sont replacés dans la cavité abdominale. La paroi musculaire et la peau sont suturées à l'aide des fils prolène 7/0 et 6/0, respectivement.

### **VI.2.2.2. Cytométrie en flux**

En vue de phénotyper les cellules immunitaires par cytométrie en flux, j'ai identifié les marqueurs d'intérêt et j'ai établi les stratégies de sélection électronique (*gating strategies*), en me basant sur une recherche bibliographique approfondie (Tableaux 6 et 7) (Figures 20-24). En collaboration avec Miltenyi Biotec, les anticorps ont été couplés aux fluorochromes correspondants pour assurer une analyse optimale des 6 panels multicolores. En premier lieu, j'ai titré les anticorps afin de déterminer les concentrations permettant la distinction des populations positives et négatives. En raison d'utilisation de plusieurs fluorochromes, des chevauchements des spectres d'émission se sont produits. Il était alors nécessaire de compenser les signaux, c'est à dire de soustraire les signaux fluorescents détectés dans un canal inhabituel des valeurs de fluorescence mesurées pour ce canal. Pour être en mesure de régler correctement les compensations, j'ai réalisé en second lieu des contrôles monomarqués positifs pour chacun des fluorochromes utilisés. Finalement, j'ai standardisé le protocole d'acquisition du cytomètre CytoFLEX S N0-V4-B2-Y4 afin de pouvoir comparer les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) au cours du temps.

À l'inverse du sang, l'obtention des suspensions cellulaires à partir de la rate, de la paroi veineuse et de la moelle osseuse nécessite une étape de broyage. Cette dernière est ensuite suivie par la lyse des globules rouges, le marquage de viabilité et le blocage des récepteurs du fragment Fc des anticorps (Tableau 8). Les marquages membranaires s'effectuent à l'abri de la lumière, à température ambiante pendant 15 minutes. Quant aux marquages intracellulaires, ils sont

précédés par une étape de fixation et de perméabilisation et se font à l'abri de la lumière, à 4°C pendant 30 minutes. L'analyse des données est réalisée sur CytExpert.

**Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés.**

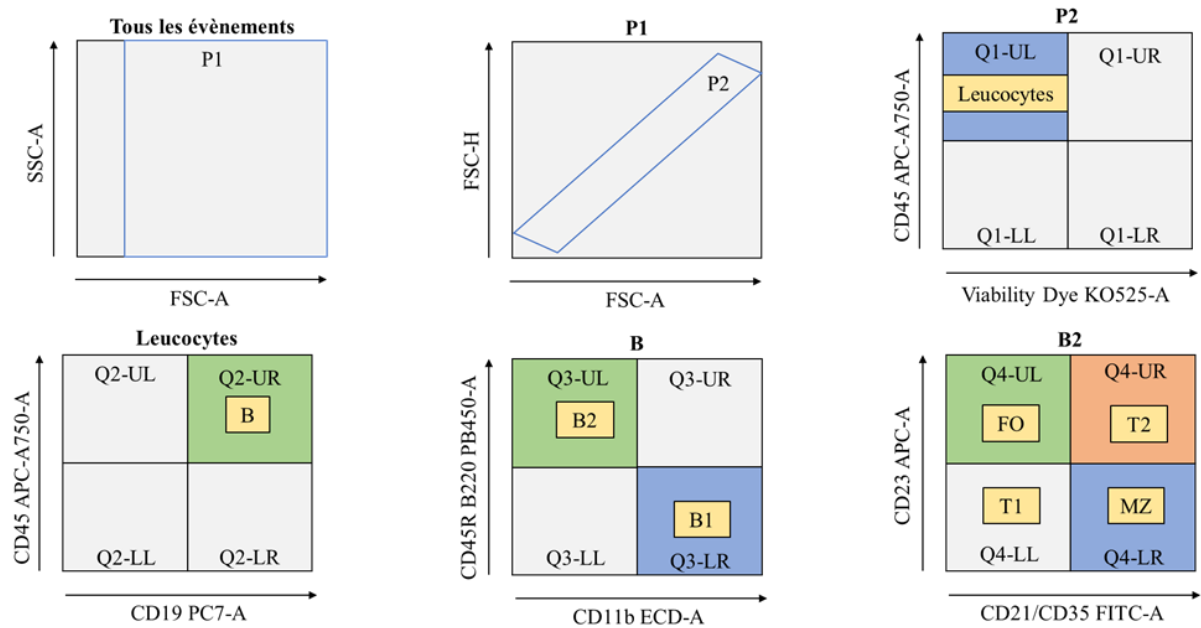
<b>Anticorps</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Référence</b>
<b>CD45</b>	APC-Vio 770	REA737	130-110-800
<b>CD19</b>	PE-Vio 770	REA749	130-112-037
<b>CD45R (B220)</b>	VioBlue	REA755	130-110-851
<b>CD11b</b>	PE-Vio 615	REA592	130-113-807
<b>CD23</b>	APC	REA1068	130-118-761
<b>CD21/CD35</b>	Vio Bright B515	REA800	130-111-735
<b>CD5</b>	PerCP-Vio 700	REA421	130-106-207
<b>CD1d</b>	PE	1B1	130-102-603
<b>CD138</b>	PE-Vio 615	REA104	130-108-989
<b>CD80</b>	Brilliant Violet 650	16-10A1	104732
<b>CD273 (PD-L2)</b>	FITC	MIH37	130-102-222
<b>CD73</b>	APC	REA778	130-111-518
<b>CD3</b>	Brilliant Violet 650	17A2	100229
<b>CD8a</b>	PE-Vio 615	REA601	130-123-914
<b>CD4</b>	VioBlue	REA604	130-118-696
<b>CD44</b>	APC	REA664	130-119-121
<b>CD62L</b>	PE-Vio 770	REA828	130-112-838
<b>CD25</b>	Vio Bright R720	REA568	130-127-476
<b>FoxP3</b>	PE	REA788	130-111-678
<b>NK1.1</b>	PerCP-Vio 700	REA1162	130-120-511
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	FITC	REA638	130-117-780
<b>Ly-6C</b>	VioBlue	REA796	130-111-921
<b>Ly-6G</b>	PerCP-Vio 700	REA526	130-117-500
<b>F4/80</b>	PE	REA126	130-116-499
<b>CD138</b>	PE	REA104	130-120-810

**Tableau 7 : Phénotypes des cellules immunitaires.**

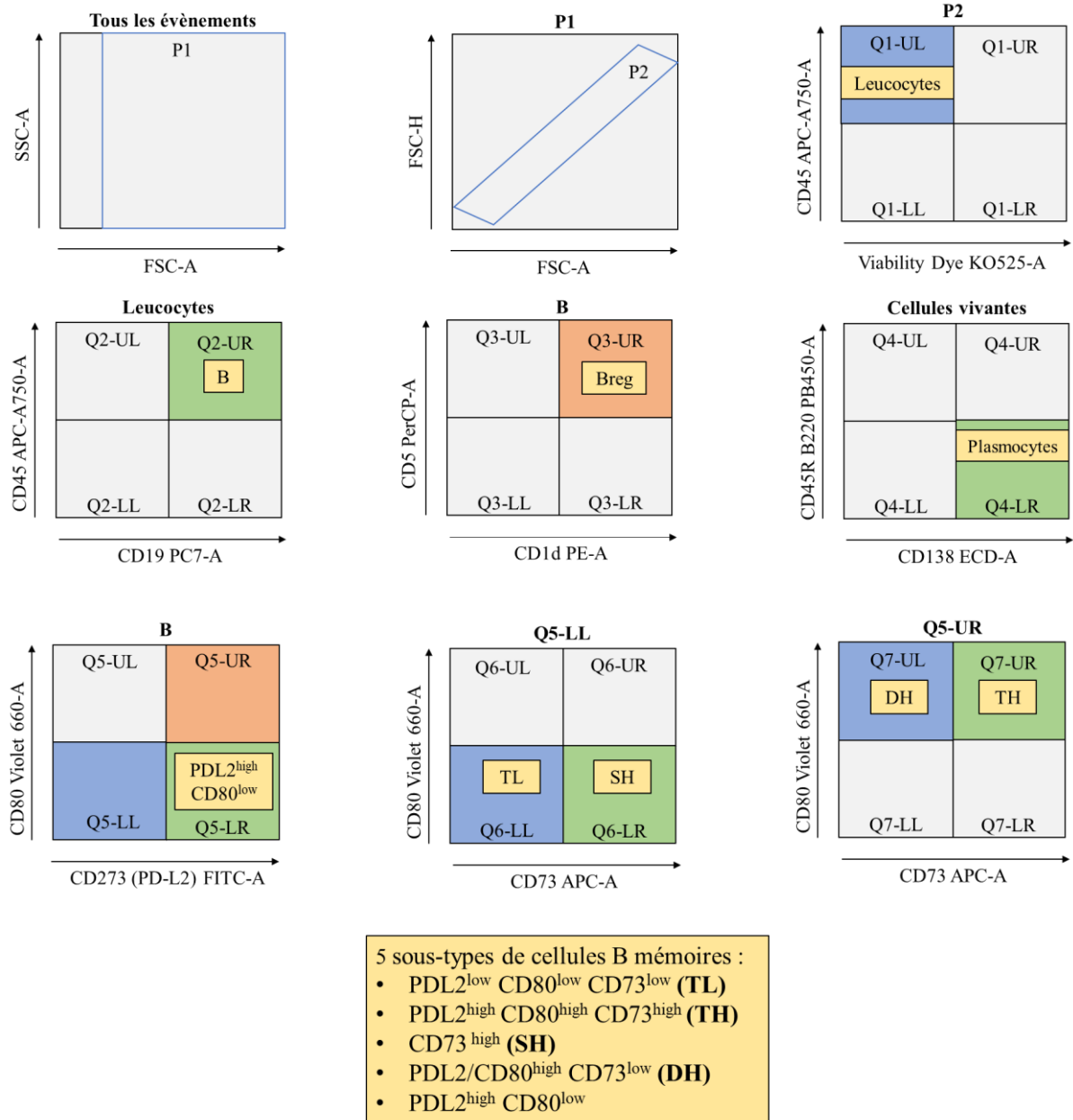
Cellule immunitaire	Phénotype
<b>B</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>
<b>B1</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD45R <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup>
<b>B2</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD45R <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup>
<b>T1</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD45R <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CD23 <sup>-</sup> CD21/CD35 <sup>-</sup>
<b>T2</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD45R <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup> CD21/CD35 <sup>high</sup>
<b>MZ</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD45R <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CD23 <sup>low</sup> CD21/CD35 <sup>high</sup>
<b>FO</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD45R <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup> CD21/CD35 <sup>low</sup>
<b>Breg</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD1d <sup>+</sup>
<b>B mémoires</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD80 <sup>low</sup> PDL2 <sup>low</sup> CD73 <sup>low</sup>
	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD80 <sup>high</sup> PDL2 <sup>high</sup> CD73 <sup>high</sup>
	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD80 <sup>high</sup> PDL2 <sup>high</sup> CD73 <sup>low</sup>
	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD80 <sup>low</sup> PDL2 <sup>low</sup> CD73 <sup>high</sup>
	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD80 <sup>low</sup> PDL2 <sup>high</sup>
<b>Plasmocytes</b>	CD45R <sup>-</sup> CD138 <sup>+</sup>
<b>T</b>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>
<b>T CD8<sup>+</sup></b>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8a <sup>+</sup>
<b>T CD4<sup>+</sup></b>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
<b>T CD8<sup>+</sup> mémoires effectrices (CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>)</b>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8a <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> CD62L <sup>-</sup>
<b>T CD8<sup>+</sup> mémoires centrales (CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub>)</b>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8a <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> CD62L <sup>+</sup>
<b>T CD8<sup>+</sup> naïves (CD8<sup>+</sup> T<sub>N</sub>)</b>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8a <sup>+</sup> CD44 <sup>low</sup> CD62L <sup>+</sup>
<b>T CD4<sup>+</sup> mémoires effectrices (CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>)</b>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> CD62L <sup>-</sup>
<b>T CD4<sup>+</sup> mémoires centrales (CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub>)</b>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> CD62L <sup>+</sup>
<b>T CD4<sup>+</sup> naïves (CD4<sup>+</sup> T<sub>N</sub>)</b>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>low</sup> CD62L <sup>+</sup>
<b>CD8<sup>+</sup> T<sub>reg</sub></b>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8a <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>
<b>CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub></b>	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>
<b>NK</b>	CD45 <sup>+</sup> NK1.1 <sup>+</sup>
<b>Neutrophiles</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> Ly-6G <sup>+</sup> Ly-6C <sup>+</sup>
<b>Monocytes inflammatoires</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> Ly-6G <sup>-</sup> F4/80 <sup>low</sup> Ly-6C <sup>+</sup>
<b>Monocytes patrouilleurs</b>	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> Ly-6G <sup>-</sup> F4/80 <sup>low</sup> Ly-6C <sup>-</sup>

**Tableau 8 : Liste des produits utilisés.**

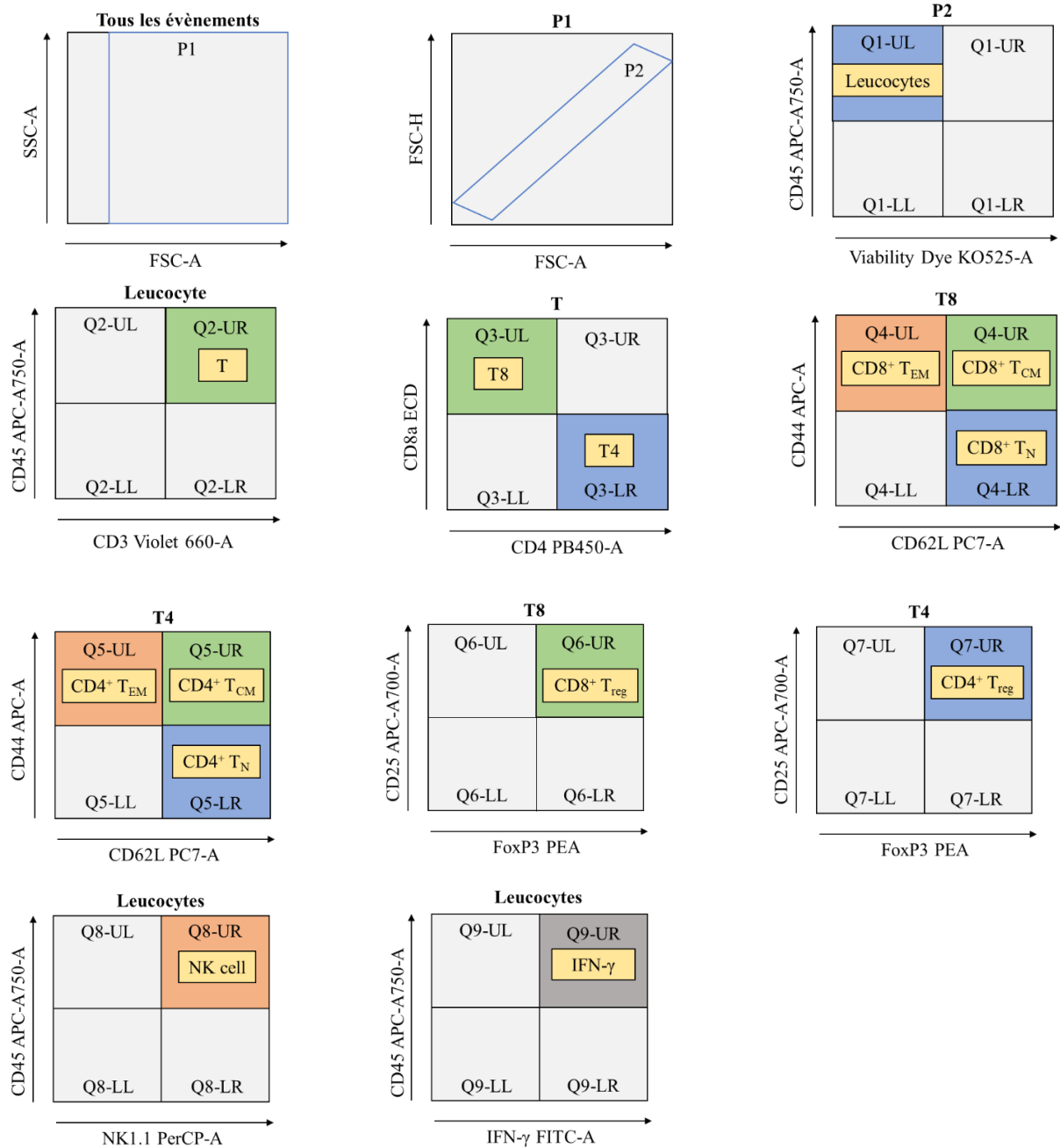
Produit	Nomenclature	Référence
<b>Billes de compensation</b>	MACS Comp Bead Kit, anti-REA	130-104-693
	VersaComp Antibody Capture Bead Kit	B22804
<b>Billes de standardisation</b>	Flow-Set Pro Fluorospheres	A63492
<b>Tampon de lyse des globules rouges</b>	Red Blood Cell Lysis Solution (10×)	130-094-183
<b>Marqueur de viabilité</b>	Viability 405/520 Fixable Dyes	130-130-404 1
<b>Bloqueur de FcR</b>	FcR Blocking Reagent mouse	130-092-575
<b>Tampons de fixation et de perméabilisation</b>	Transcription Factor Staining Buffer Set	130-122-981



**Figure 20 : Stratégie d'analyse des cellules B au niveau de la rate (Panel 1).** P1, cellules dépourvues de débris ; P2, cellules vivantes ; Q1-UL, leucocytes ; Q2-UR, cellules B ; Q3-LR, cellules B1 ; Q3-UL, cellules B2 ; Q4-LL, cellules T1 ; Q4-LR, cellules MZ ; Q4-UL, cellules FO ; Q4-UR, cellules T2.

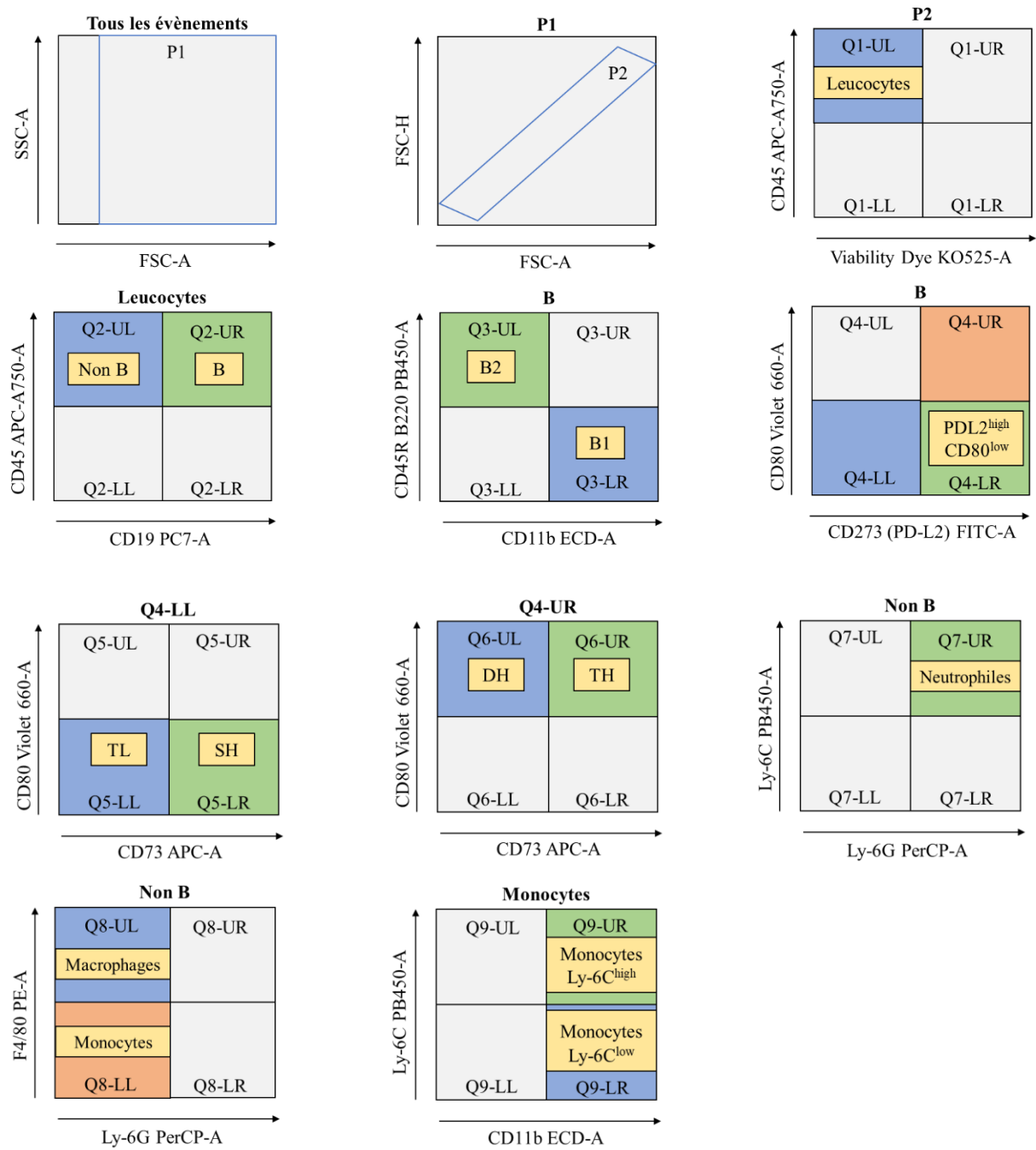


**Figure 21 : Stratégie d'analyse des cellules B au niveau de la rate (Panel 2).** P1, cellules dépourvues de débris; P2, cellules vivantes; Q1-UL, leucocytes; Q2-UR, cellules B; Q3-UR, cellules Breg; Q4-LR, plasmocytes; Q5-LR, cellules PDL2<sup>high</sup> CD80<sup>low</sup>; Q6-LL, cellules PDL2<sup>low</sup> CD80<sup>low</sup> CD73<sup>low</sup>; Q6-LR, cellules CD73<sup>high</sup>; Q7-UL, cellules PDL2/CD80<sup>high</sup> CD73<sup>low</sup>; Q7-UR, cellules PDL2<sup>high</sup> CD80<sup>high</sup> CD73<sup>high</sup>.

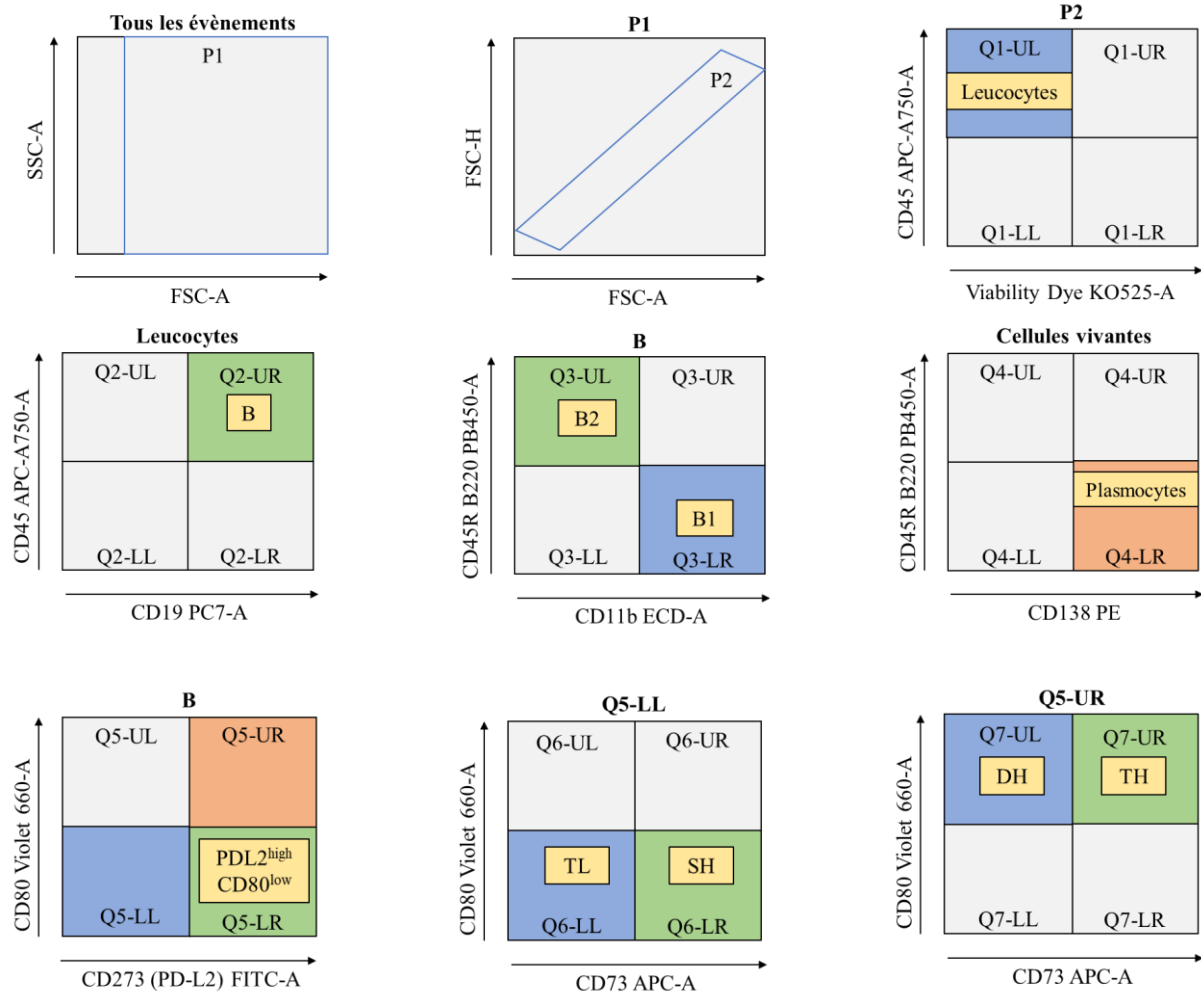


**Figure 22 : Stratégie d'analyse des cellules T, NK et des leucocytes sécrétant l'IFN- $\gamma$  au niveau de la rate (Panel 3) et du sang (Panel 4).** P1, cellules dépourvues de débris; P2, cellules vivantes; Q1-UL, leucocytes; Q2-UR, cellules T; Q3-LR, cellules T CD4<sup>+</sup>; Q3-UL, cellules T CD8<sup>+</sup>; Q4-LR, cellules CD8<sup>+</sup> T<sub>N</sub>; Q4-UL, cellules CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>; Q4-UR, cellules CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub>; Q5-LR, cellules CD4<sup>+</sup> T<sub>N</sub>; Q5-UL, cellules CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>; Q5-UR, cellules CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub>; Q6-UR, cellules CD8<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>; Q7-UR, cellules CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>; Q8-UR, cellules NK; Q9-UR, leucocytes sécrétant l'IFN- $\gamma$ .





**Figure 23 : Stratégie d'analyse des cellules B, des neutrophiles et des monocytes au niveau du sang (Panel 5).** P1, cellules dépourvues de débris; P2, cellules vivantes; Q1-UL, leucocytes; Q2-UL, leucocytes autres que les cellules B; Q2-UR, cellules B; Q3-LR, cellules B1; Q3-UL, cellules B2; Q4-LR, cellules PDL2<sup>high</sup> CD80<sup>low</sup>; Q5-LL, cellules PDL2<sup>low</sup> CD80<sup>low</sup> CD73<sup>low</sup>; Q5-LR, cellules CD73<sup>high</sup>; Q6-UL, cellules PDL2/CD80<sup>high</sup> CD73<sup>low</sup>; Q6-UR, cellules PDL2<sup>high</sup> CD80<sup>high</sup> CD73<sup>high</sup>; Q7-UR, neutrophiles; Q8-LL, monocytes; Q8-UL, macrophages; Q9-LR, monocytes Ly-6C<sup>low</sup>; Q9-UR, monocytes Ly-6C<sup>high</sup>.



**Figure 24 : Stratégie d'analyse des cellules B au niveau de la moelle osseuse (Panel 6).** P1, cellules dépourvues de débris; P2, cellules vivantes; Q1-UL, leucocytes; Q2-UR, cellules B; Q3-LR, cellules B1; Q3-UL, cellules B2; Q4-LR, plasmocytes; Q5-LR, cellules PDL2<sup>high</sup> CD80<sup>low</sup>; Q6-LL, cellules PDL2<sup>low</sup> CD80<sup>low</sup> CD73<sup>low</sup>; Q6-LR, cellules CD73<sup>high</sup>; Q7-UL, cellules PDL2/CD80<sup>high</sup> CD73<sup>low</sup>; Q7-UR, cellules PDL2<sup>high</sup> CD80<sup>high</sup> CD73<sup>high</sup>.

### VI.2.3. Résultats préliminaires de l'article 2

Avant de caractériser les cellules B, T et NK durant la phase chronique de la MVTE, j'ai quantifié leurs taux au niveau de la paroi veineuse à J2. Le taux de cellules B est augmenté au niveau de la paroi veineuse des souris ayant subi la thrombose veineuse par rapport aux souris sham. En revanche, le taux de cellules NK, T, T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> n'est pas affecté (Figure 25). Ces résultats suggèrent la participation des cellules B à la phase aiguë de la MVTE.

Afin d'évaluer la réponse immunitaire au cours du temps, j'ai comparé les taux de différentes populations immunitaires entre J2 et J7 au niveau de la rate, du sang et de la moelle osseuse. Comme déjà présentés dans l'introduction, les lymphocytes B sont divisés en cellules B1 et B2 qui diffèrent par leur rôle, leur localisation anatomique ainsi que leurs marqueurs de surface CD45R et CD11b. Les lymphocytes B immatures quittent la moelle osseuse sous forme de cellules transitionnelles de type 1 (T1) et se différencient au niveau de la rate en cellules transitionnelles de type 2 (T2). Ces dernières donnent naissance à deux sous-types de lymphocytes B matures : les cellules B folliculaires (FO) et les cellules B de la zone marginale (MZ) impliquées dans les réponses humorales thymo-dépendantes et thymo-indépendantes (275). Après avoir rencontré l'antigène, les lymphocytes B folliculaires se différencient en plasmocytes extrafolliculaires à courte durée de vie et de forte affinité, en cellules B mémoires précoces de faible affinité ou en cellules B formant le centre germinatif (CG). Au niveau du CG, les processus d'hypermutation somatique et de commutation isotypique se produisent. Il s'ensuit la différenciation des lymphocytes B de forte affinité en cellules B mémoires ou en plasmocytes à longue durée de vie (276) (274) (Figure 19). Les cellules B mémoires étant hétérogènes, les marqueurs CD80, PD-L2 et CD73 permettent de distinguer au moins cinq phénotypes différents : PDL2<sup>low</sup> CD80<sup>low</sup> CD73<sup>low</sup> (TL), CD73<sup>high</sup> (SH), PDL2<sup>high</sup> CD80<sup>low</sup>, PDL2/CD80<sup>high</sup> CD73<sup>low</sup> (DH) et PDL2<sup>high</sup> CD80<sup>high</sup> CD73<sup>high</sup> (TH). L'expression progressive de ces marqueurs par les cellules B naïves contribue à l'acquisition des propriétés des cellules B mémoires. Ainsi, les cellules PDL2/CD80<sup>high</sup> CD73<sup>low</sup> (DH) et PDL2<sup>high</sup> CD80<sup>high</sup> CD73<sup>high</sup> (TH) sont proches du phénotype des cellules B mémoires et sont caractérisées par des isotypes commutés et des taux de mutations élevés. En revanche, les cellules PDL2<sup>low</sup> CD80<sup>low</sup> CD73<sup>low</sup> (TL) et CD73<sup>high</sup> (SH) sont proches du phénotype des cellules B naïves et présentent de faibles taux de commutations isotypiques et de mutations somatiques (277) (278).

Au niveau de la rate, les taux de lymphocytes B et B2 semblent être similaires entre J2 et J7. Cependant, j'ai constaté une légère augmentation des lymphocytes B de la zone marginale (CD23<sup>low</sup> CD21/CD35<sup>high</sup>) et des plasmocytes à J7 par rapport à J2. Quant aux cellules Breg, leurs taux sont extrêmement faibles aux deux temps (Figures 32 et 33). Comparé à J2, le taux sanguin de lymphocytes B a augmenté à J7 et s'accompagne d'une élévation du pourcentage de lymphocytes B mémoires CD73<sup>+</sup>. Bien que les cellules B CD73<sup>+</sup> partagent des similitudes phénotypiques avec les cellules B naïves, elles commencent toutefois à se rapprocher progressivement du phénotype des cellules B mémoires en exprimant le marqueur CD73 (Figure 36). En raison du nombre limité de fluorochromes, je n'ai pas analysé le taux sanguin de plasmocytes. Néanmoins, j'ai envisagé d'ajouter un troisième panel sanguin pour les prochaines expériences. Ce nouveau panel comprendra entre autres les anticorps CD138, IgM et IgG afin d'identifier les plasmocytes présentant une commutation isotypique et de quantifier les immunoglobulines. D'un autre côté, j'ai observé une réduction du taux de lymphocytes B médullaires à J7 par rapport à J2, suggérant leur migration de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires via la circulation sanguine (Figure 37).

En plus des lymphocytes B, j'ai caractérisé les lymphocytes T au niveau de la rate et du sang. Les cellules T<sub>CM</sub> sont caractérisées par l'expression des marqueurs d'adhésion CD62L et CCR7, ce qui leur permet de circuler à travers le sang et les tissus lymphoïdes secondaires. Suite à une stimulation antigénique, les cellules T<sub>CM</sub> prolifèrent rapidement et se différencient en cellules effectrices spécifiques de l'antigène. Quant aux cellules T<sub>EM</sub> n'exprimant pas le CD62L et le CCR7, elles migrent entre le sang, les tissus périphériques et la rate. Ces cellules ont une fonction effectrice comme la sécrétion de cytokines et la cytotoxicité. Les cellules T<sub>EM</sub> se distinguent des cellules T effectrices par leur capacité à persister après l'élimination du pathogène. D'autre part, le marqueur d'activation CD44 permet de distinguer les cellules T mémoires et T effectrices des cellules T naïves (199). Les taux de lymphocytes T, T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> sont similaires entre J2 et J7 au niveau de la rate. Cependant, j'ai constaté une augmentation des cellules CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>, CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub>, CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> et CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> à J7 par rapport à J2. Cette augmentation est associée à une diminution des cellules CD8<sup>+</sup> T<sub>N</sub>, CD4<sup>+</sup> T<sub>N</sub> et CD4<sup>+</sup> Treg (Figure 34). Au niveau du sang, j'ai observé une augmentation des lymphocytes T et T CD8<sup>+</sup> ainsi qu'une diminution de T CD4<sup>+</sup> à J7 par rapport à J2. Les cellules sanguines CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>, CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> et CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> sont absentes à J2, mais sont détectées à J7. En revanche, le taux des cellules CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> n'est que légèrement altéré entre J2 et J7. Comme dans la rate, le taux des cellules CD8<sup>+</sup> T<sub>N</sub> est réduit dans le sang (Figure 35). En somme, ces résultats montrent une

augmentation des cellules  $T_{EM}$  et  $T_{CM}$  et une diminution des cellules  $T_N$ , à la fois au niveau de la rate et du sang, suggérant l'activation de la réponse mémoire des cellules T. Outre l'immunité adaptative, j'ai évalué le taux des monocytes, des neutrophiles et des cellules NK. Comparé à J2, le taux sanguin de cellules NK est augmenté à J7.

Bien que ces résultats soient encore très préliminaires, les lymphocytes B circulants ont l'air d'augmenter à J7, suggérant une mobilisation des lymphocytes B vers les organes lymphoïdes secondaires. De plus, il semble que les cellules B et T mémoires commencent à s'activer à J7. Nous pourrions nous attendre peut-être à une augmentation du nombre de cellules T mémoires et de plasmocytes, ainsi qu'à une acquisition d'un phénotype B mémoire plus prononcé avec le temps.

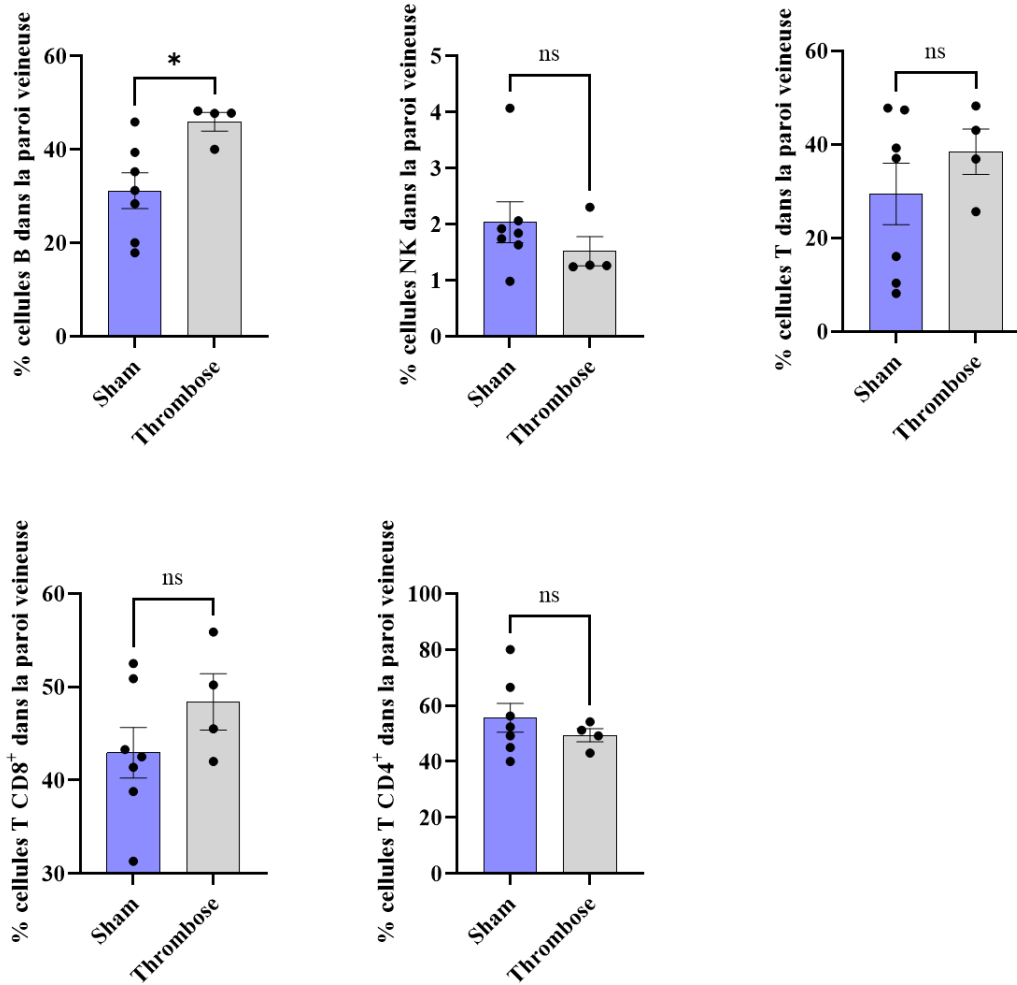
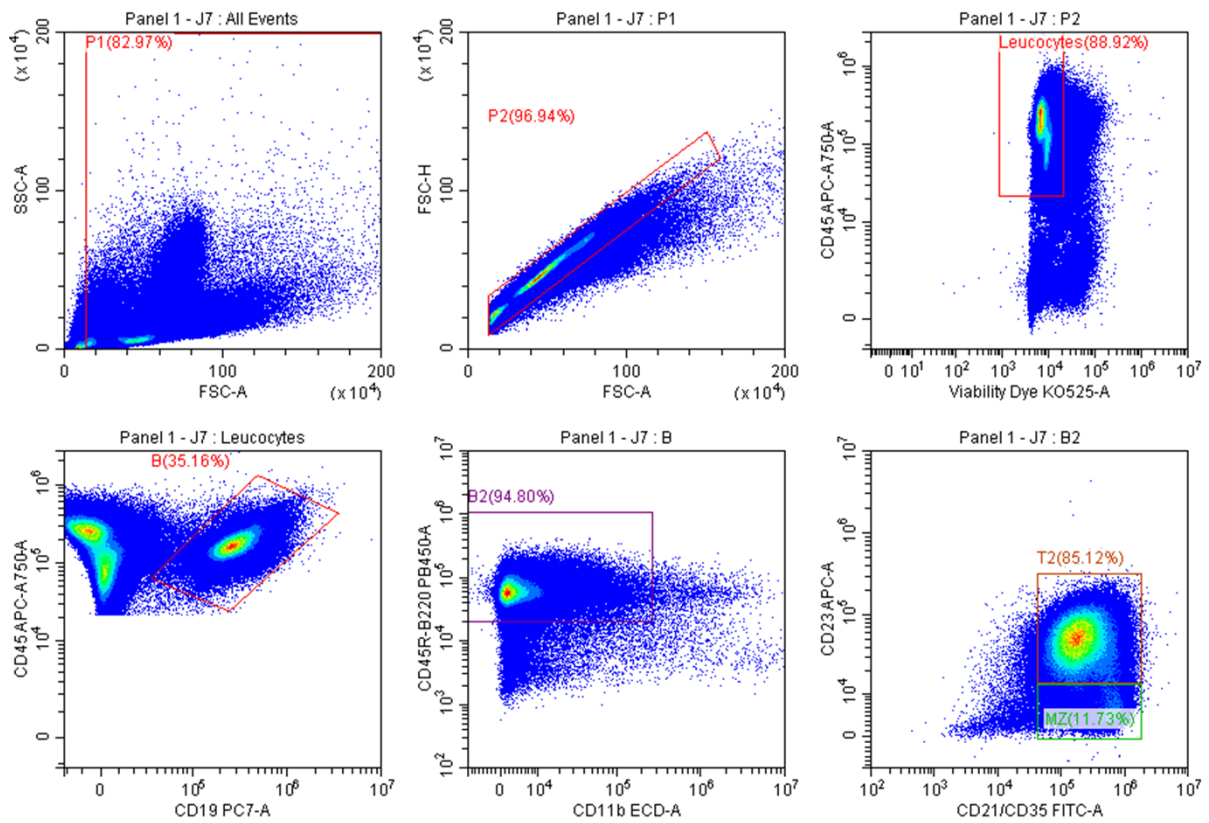
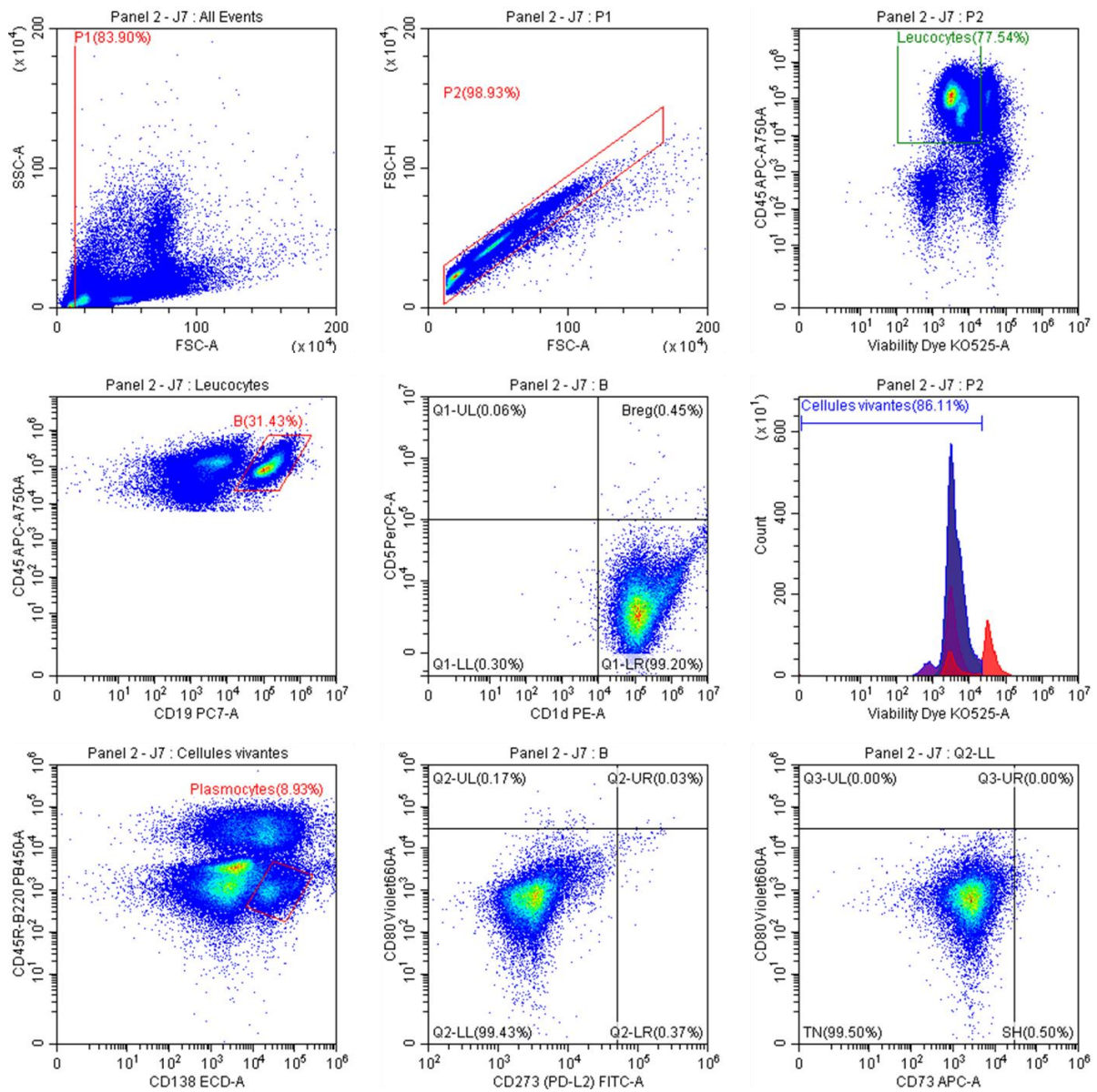


Figure 25 : Taux de cellules B, NK, T, T CD8+ et TCD4+ au niveau de la paroi veineuse de souris sham ou ayant subi la thrombose veineuse.

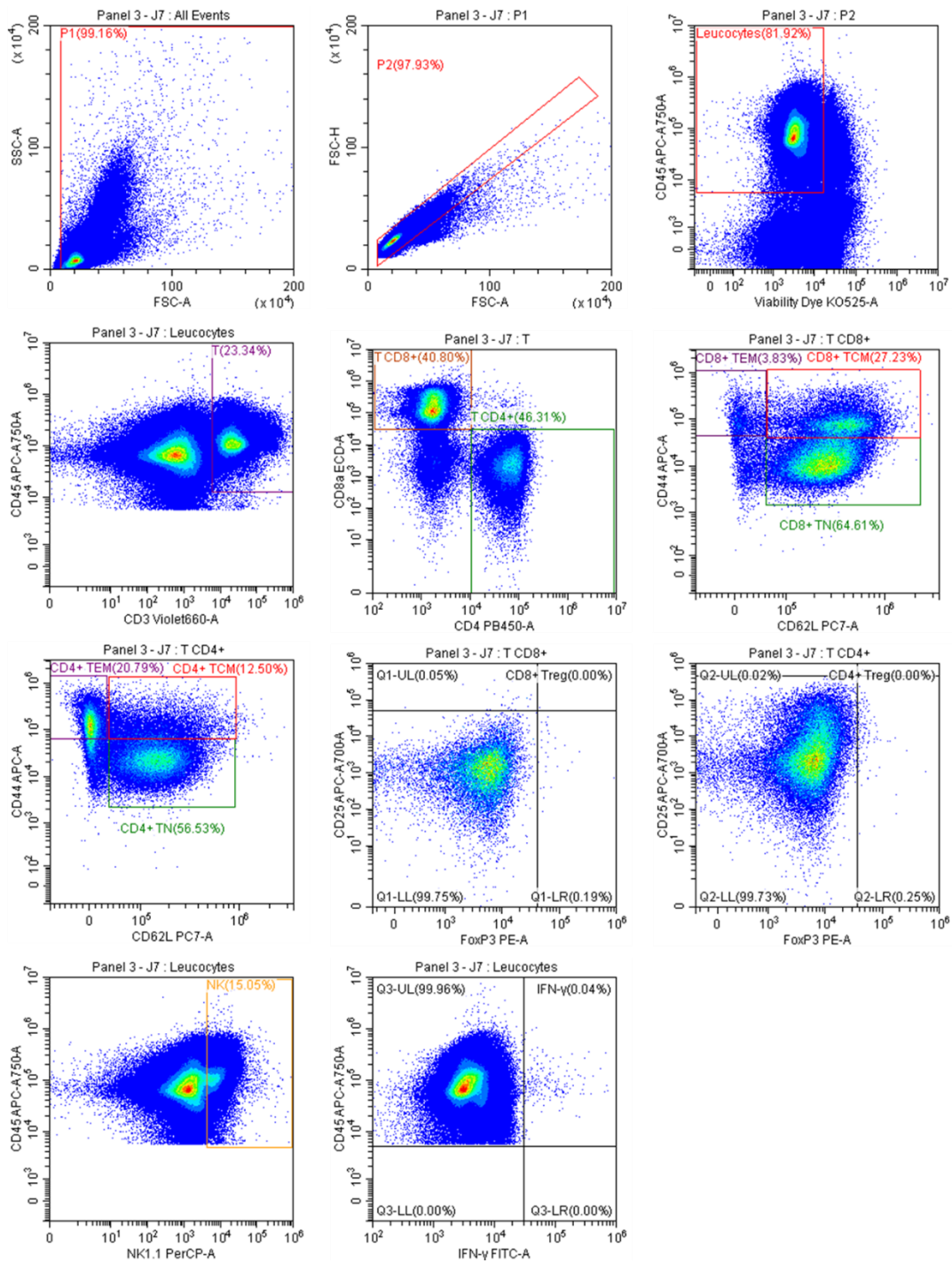


**Figure 26 : Caractérisation des cellules B au niveau de la rate d'une souris à J7 (Panel 1). Quantification des cellules B, B2 et des sous-types de B2.**

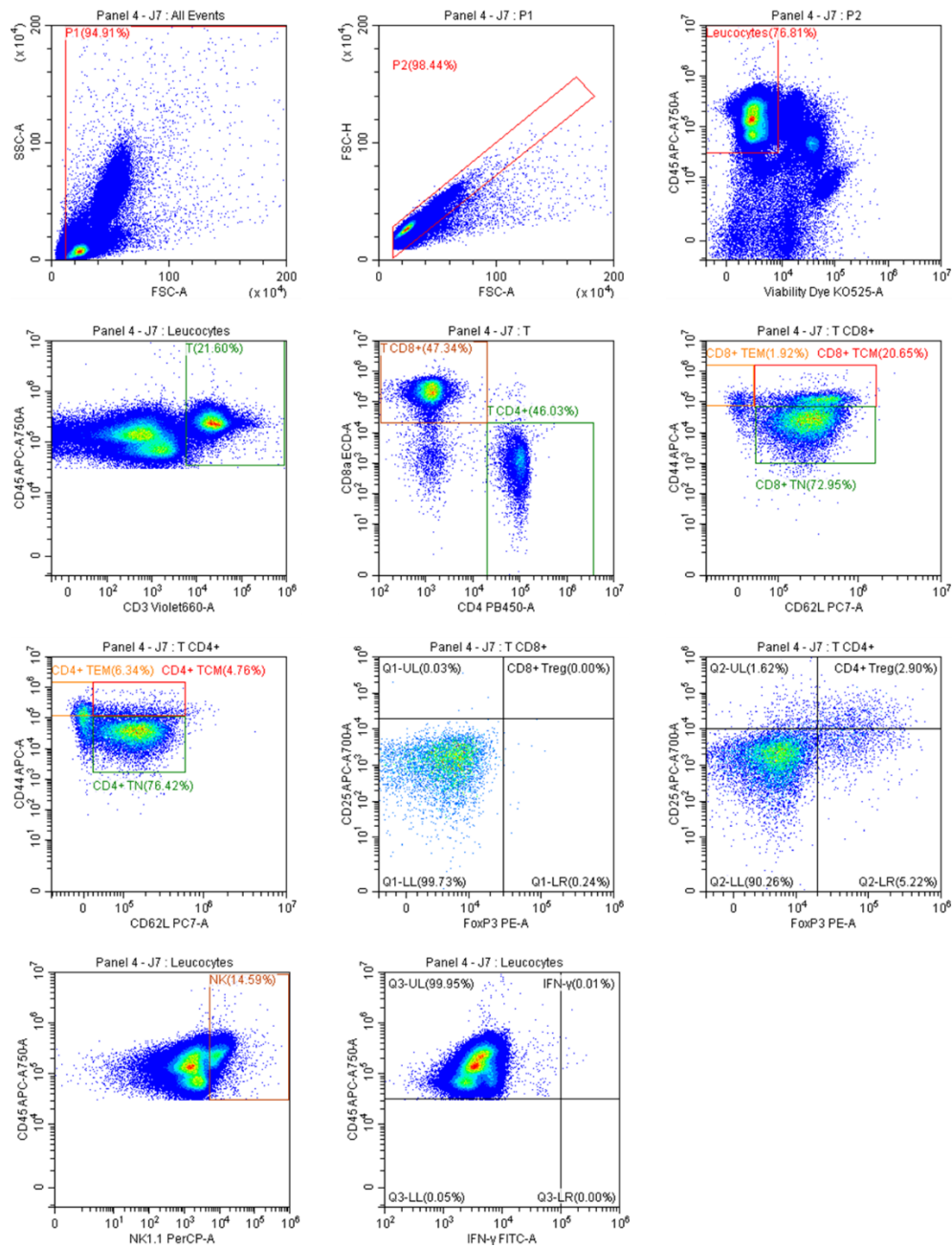


**Figure 27 : Caractérisation des cellules B au niveau de la rate d'une souris à J7 (Panel 2). Quantification des cellules Breg, B mémoires et des plasmocytes.**

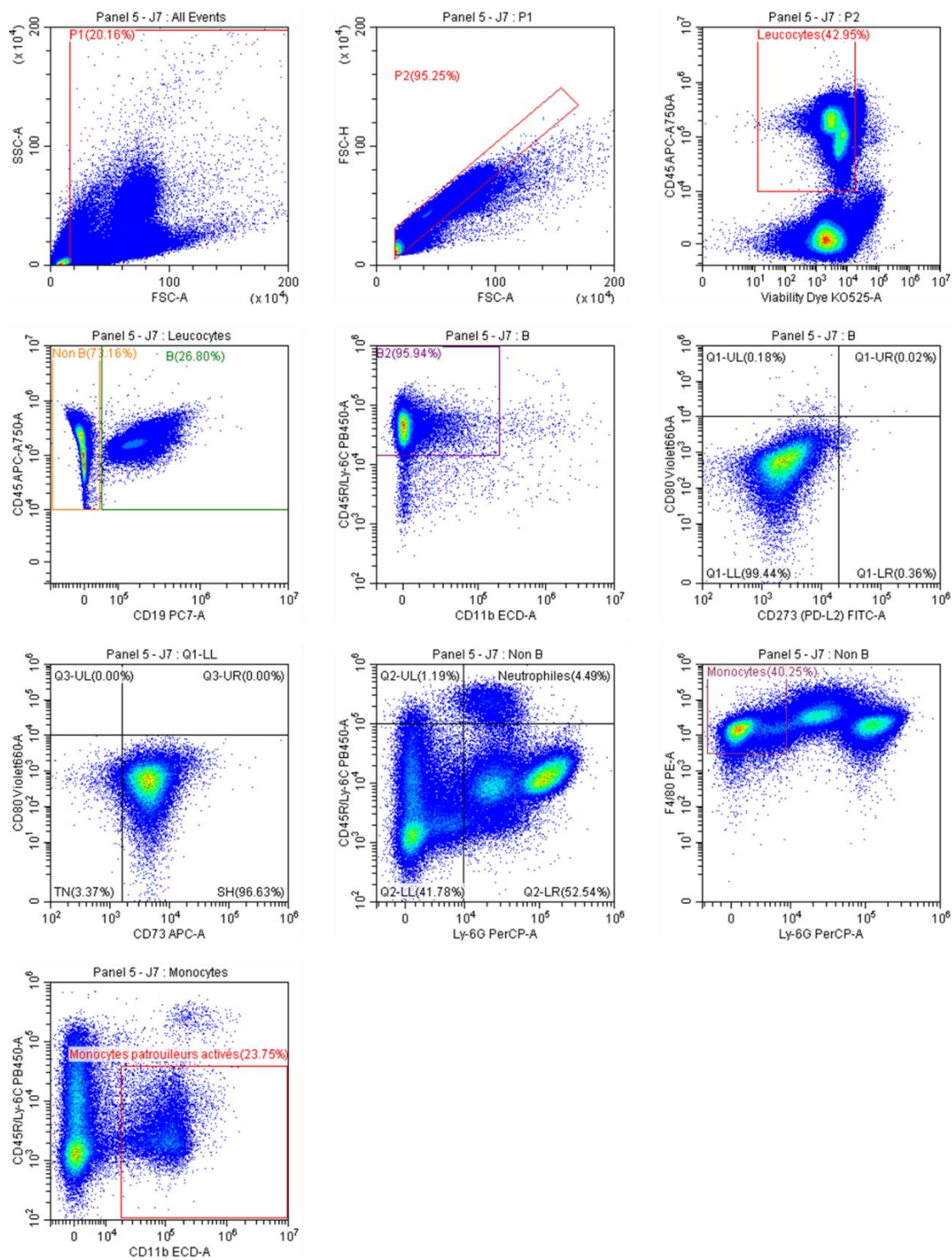




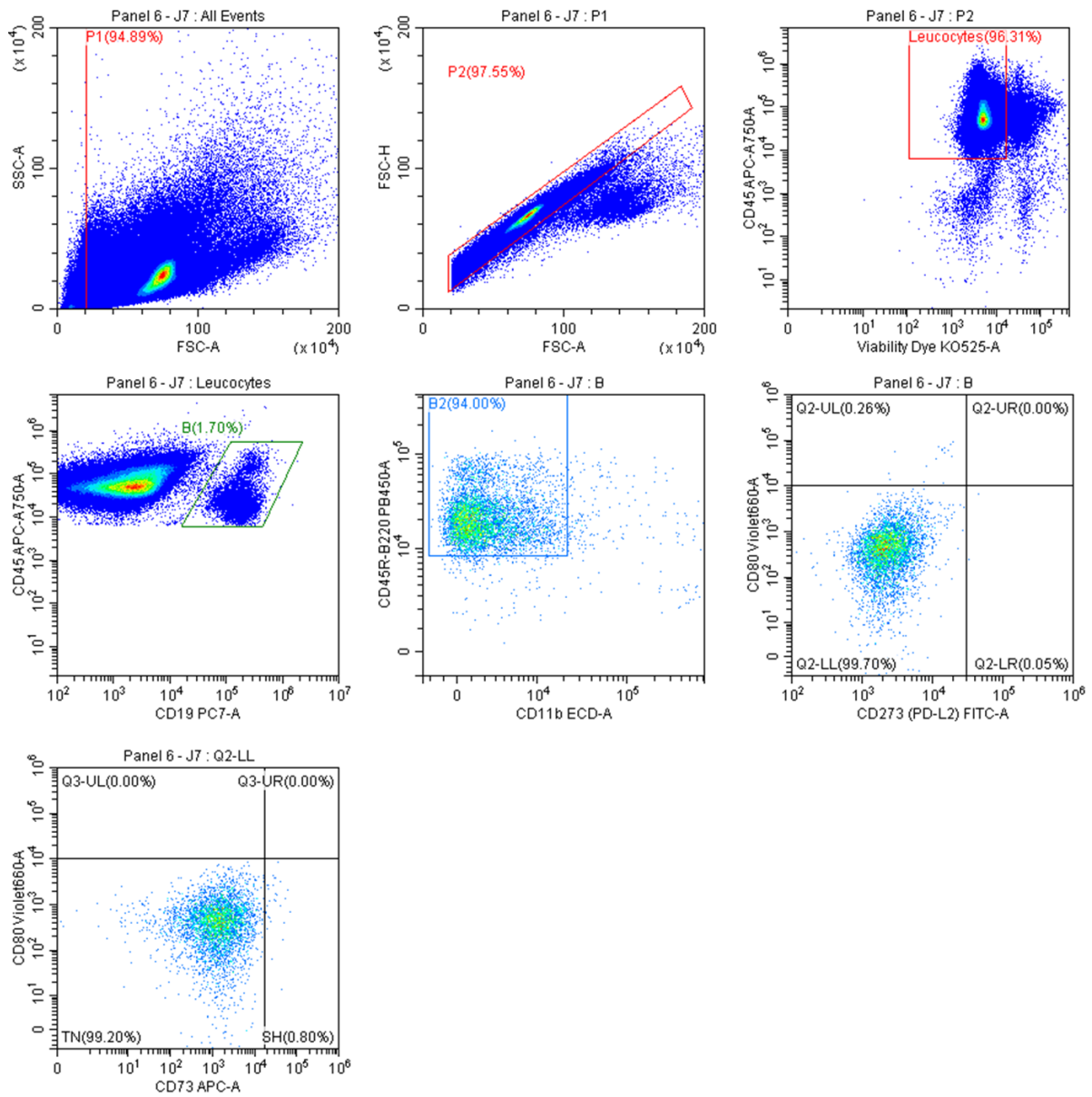
**Figure 28 : Caractérisation des cellules T, NK et CD45<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> au niveau de la rate d'une souris à J7 (Panel 3). Quantification des cellules T, T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, T mémoires, Treg, NK et des leucocytes sécrétant l'IFN- $\gamma$ .**



**Figure 29 : Caractérisation des cellules T, NK et CD45<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> au niveau du sang d'une souris à J7 (Panel 4).** Quantification des cellules T, T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, T mémoires, Treg, NK et des leucocytes sécrétant l'IFN- $\gamma$ .



**Figure 30 : Caractérisation des cellules B et des granulocytes au niveau du sang d'une souris à J7 (Panel 5). Quantification des cellules B, B2, B mémoires, des neutrophiles et des monocytes.**



**Figure 31 : Caractérisation des cellules B au niveau de la moelle osseuse d'une souris à J7 (Panel 6). Quantification des cellules B, B2 et B mémoires.**

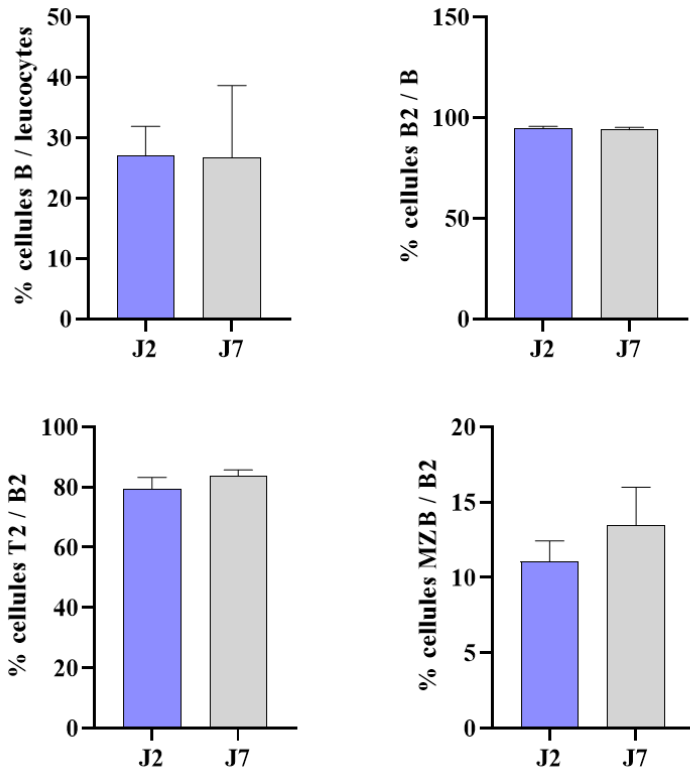


Figure 32 : Taux de cellules B, B2, T2 et MZB au niveau de la rate à J2 et J7 (n = 2/temps).

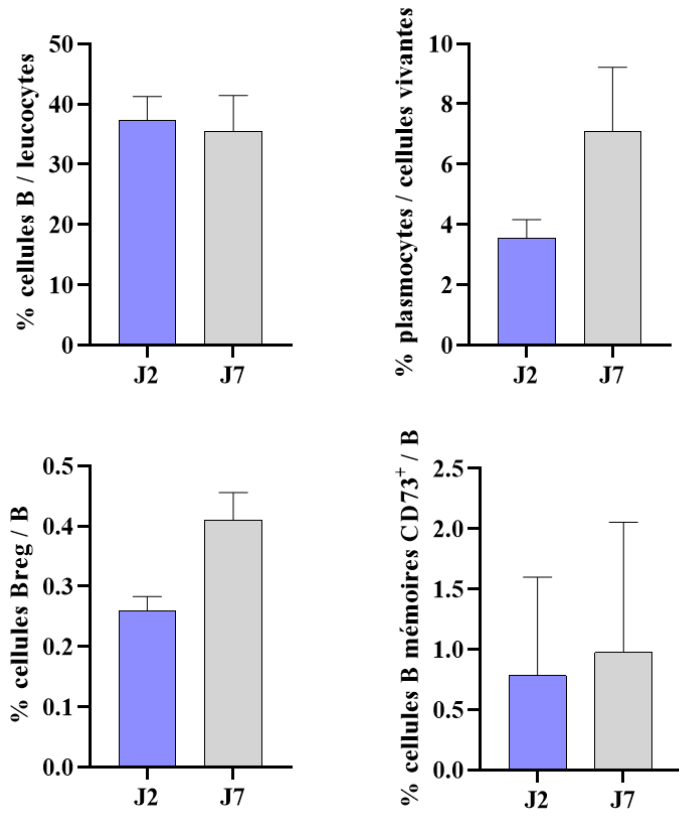


Figure 33 : Taux de cellules B, Breg, B mémoires CD73<sup>+</sup> et de plasmocytes au niveau de la rate à J2 et J7 (n = 2/temps).

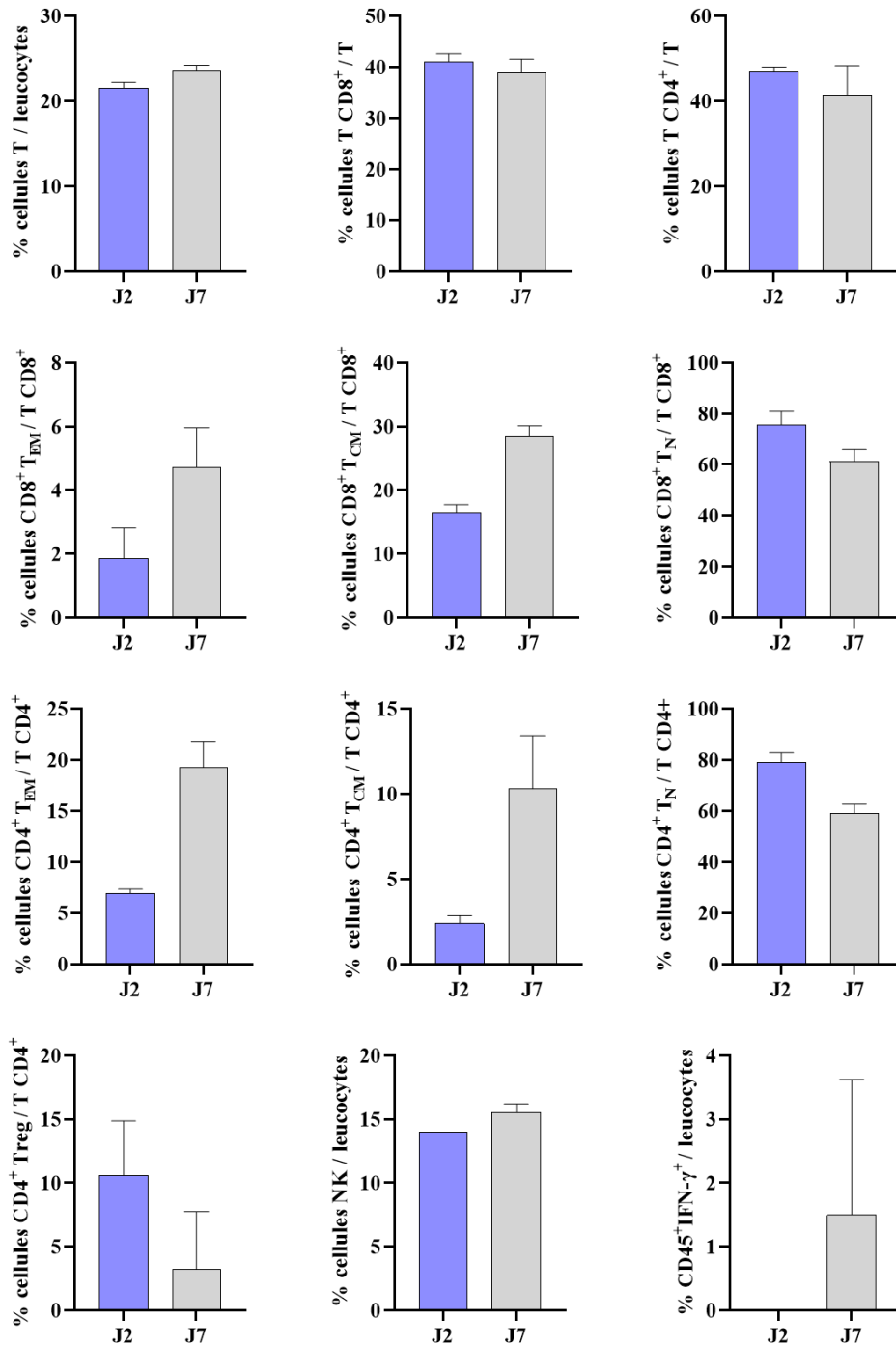


Figure 34 : Taux de cellules T, T4, T8, T<sub>EM</sub>, T<sub>CM</sub>, T<sub>N</sub>, Treg, NK et CD45<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> au niveau de la rate à J2 et J7 (n = 2/temps).

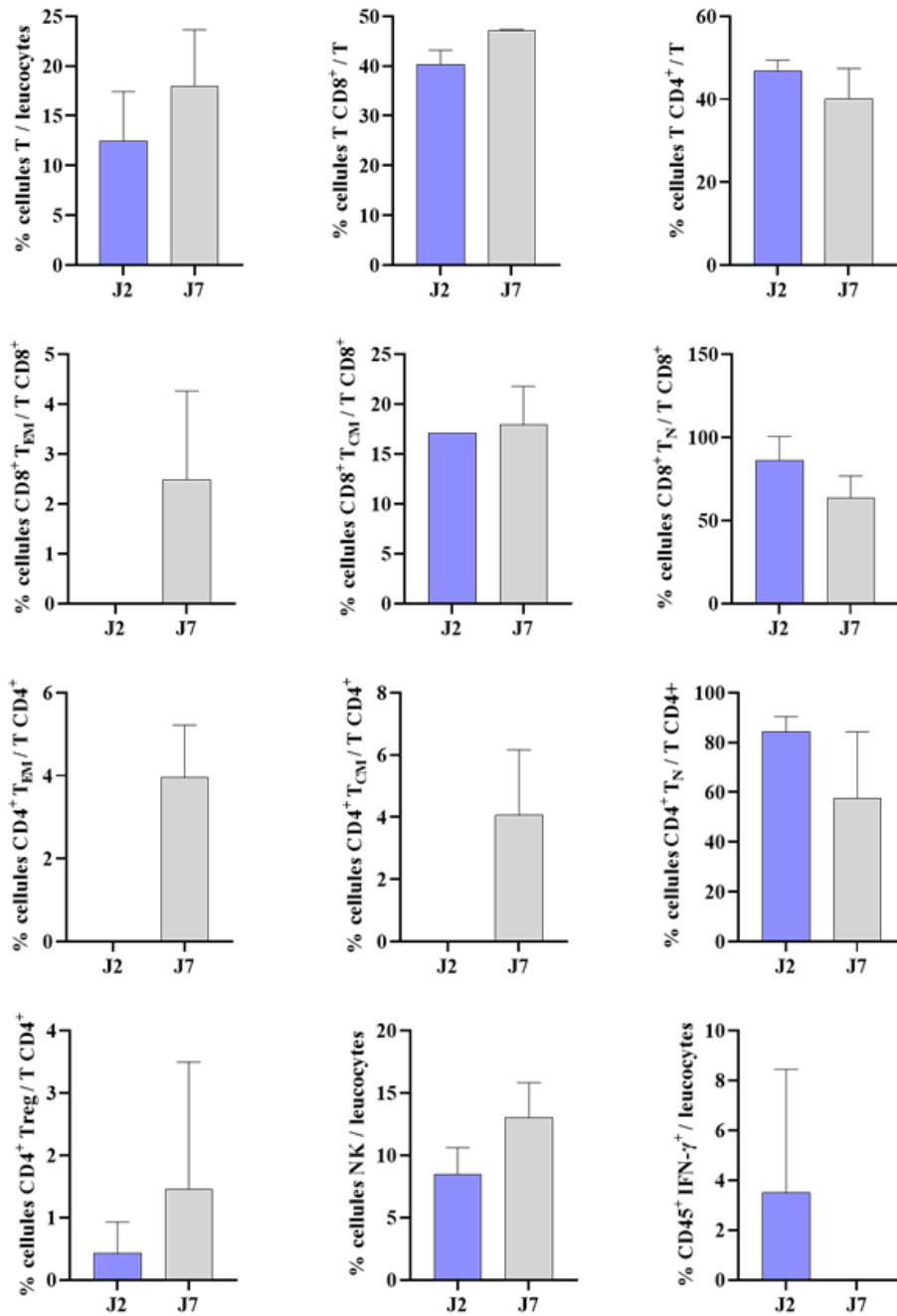


Figure 35 : Taux de cellules T, T4, T8, T<sub>EM</sub>, T<sub>CM</sub>, T<sub>N</sub>, Treg, NK et CD45<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> au niveau du sang à J2 et J7 (n = 2/temps).



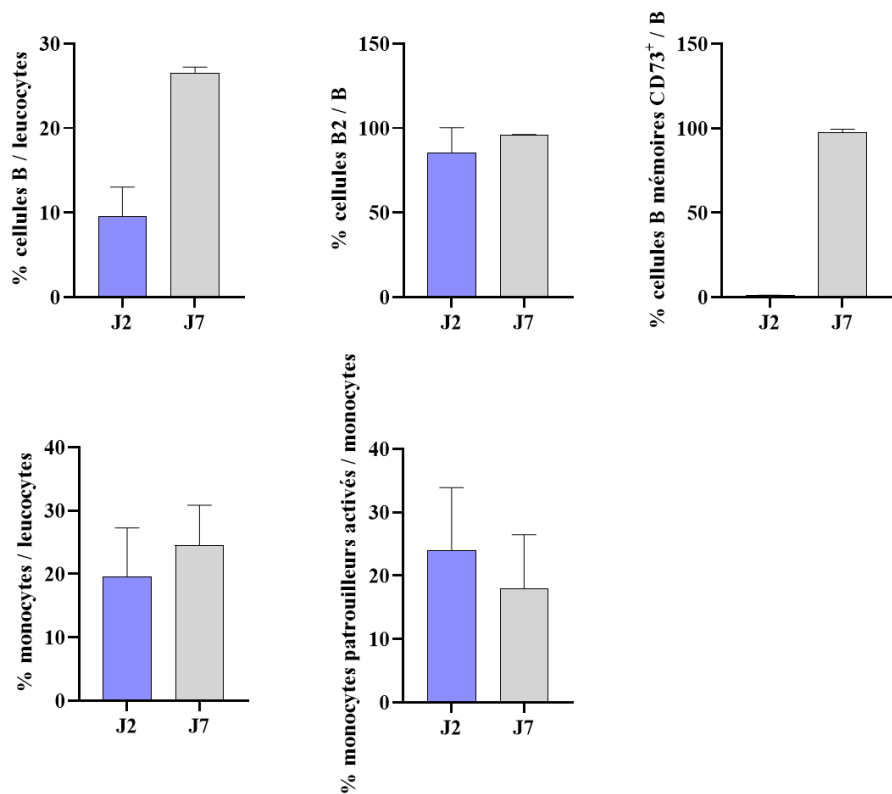


Figure 36 : Taux de cellules B, B2, B mémoires CD73<sup>+</sup> et de monocytes au niveau du sang à J2 et J7 (n = 2/temps).

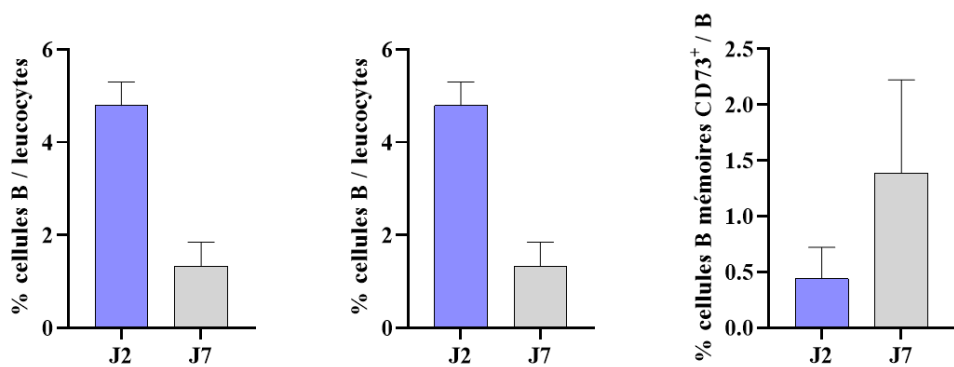


Figure 37 : Taux de cellules B, B2 et B mémoires CD73<sup>+</sup> au niveau de la moelle osseuse à J2 et J7 (n = 2/temps).

# **DISCUSSION**

## VII. Discussion générale

Mon projet de thèse a montré pour la première fois la contribution de l'ARNe à la MVTE via le TLR3. Au cours de la MVTE, des dommages tissulaires se produisent, générant la libération des DAMPs dans le compartiment extracellulaire, tels que la HMGB1, l'ATP, l'ADN et l'ARN. L'activation combinée de TLR2, TLR4 et RAGE par la protéine HMGB1 induit la MVTE en stimulant la NETose, le recrutement des monocytes et l'agrégation plaquettaire (102). D'un autre côté, l'ATP semble participer à la MVTE en activant l'inflammasome NLRP3, en augmentant le taux de P-sélectine et de vWF, ainsi qu'en potentialisant la formation d'agrégats leuco-plaquettaires (225) (226). Quant aux ADN extracellulaires issus de la NETose ou NETs, ils exercent leurs effets prothrombotiques en favorisant l'activation des voies de coagulation, le recrutement plaquettaire et l'inactivation des protéines anticoagulantes naturelles (66). Cependant, le rôle des ARNe dans la MVTE n'a pas encore été élucidé.

En condition homéostatique, les ARN sont faiblement détectés dans les fluides extracellulaires (<100 ng/ml). Cependant, leurs concentrations augmentent considérablement suite aux dommages tissulaires induits par l'hypoxie, l'inflammation ou le cancer (279) (280). Les ARNe peuvent être de natures variées et regroupent entre autres les micro-ARN, les ARN ribosomiaux, messagers et de transfert. Afin d'éviter leur dégradation par les ribonucléases, les ARNe forment des complexes ribonucléoprotéiques ou sont contenus à l'intérieur de vésicules extracellulaires, telles que les microvésicules, les corps apoptotiques ou les exosomes (281). Les ARNe sont des alarmines contribuant entre autres aux maladies cardiovasculaires à travers plusieurs mécanismes. En effet, ils augmentent la perméabilité vasculaire en interagissant avec le VEGF et induisent le recrutement des neutrophiles via l'expression des molécules d'adhésion. De plus, ils favorisent l'angiogenèse, l'apoptose des cardiomyocytes et la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire. Cette polarisation s'accompagne d'une augmentation d'expression des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-12. Par ailleurs, les ARNe présentent des effets procoagulants dans la thrombose artérielle en agissant comme cofacteurs de la sérine protéase FSAP, du FXII, du FXI, de la kallicréine et du kininogène de haut poids moléculaire (240).

Mes travaux de recherche ont identifié un nouveau mécanisme prothrombotique des ARNe dans la MVTE. Mes expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré que les ARNe induisent le recrutement des neutrophiles via le récepteur TLR3 et exercent un effet procoagulant en réduisant l'expression de la protéine anticoagulante TFPI. Le TLR3 est un récepteur de

l'immunité innée reconnaissant l'ARN double brin (dsRNA) et son analogue synthétique le poly(I:C), l'ARNm endogène, ainsi que les petits ARN interférents (252) (253) (254). Plusieurs études ont proposé un rôle prothrombotique du TLR3. En effet, Shibamiya et al. ont révélé que l'activation de TLR3 par le poly(I:C) augmente l'expression du facteur tissulaire et réduit celle de la thrombomoduline au niveau des cellules endothéliales. Ces effets procoagulants s'accompagnent d'une augmentation du taux plasmatique des D-dimères et du dépôt de fibrinogène chez des souris contrôles mais pas chez celles déficientes en TLR3 (TLR3<sup>-/-</sup>), soulignant un rôle crucial de ce récepteur dans la coagulation et la fibrinolyse (269). D'autre part, Bhagat et al. ont constaté que les ARNe activent l'expression du FT via la voie TLR3-ERK1/2-API en condition hypoxique (282). Outre son intervention dans les voies de coagulation et de fibrinolyse, le TLR3 contribue à la dysfonction endothéliale en altérant la vasodilatation, en amplifiant la production des dérivés réactifs de l'oxygène et en réduisant la régénération endothéliale (270). En plus de son rôle prothrombotique, le TLR3 régule l'activité pro-tumorale. En effet, Tavora et al. ont montré que les ARN double brin libérés par les cellules cancéreuses se lient aux récepteurs endothéliaux TLR3, induisant la formation de la protéine SLIT2. Cette dernière favorise l'intravasation des cellules cancéreuses et leur dissémination métastatique en agissant sur le récepteur tumoral ROBO1 (*Roundabout guidance receptor 1*) (283). En plus des effets prothrombotiques et protumoraux mentionnés ci-dessus, le TLR3 présente également des rôles bénéfiques dans l'hypertension pulmonaire, la fibrose pulmonaire idiopathique et l'athérosclérose. La réduction d'expression de TLR3 entraîne l'apoptose des cellules endothéliales et un remodelage vasculaire pulmonaire, qui sont à l'origine de l'hypertension pulmonaire (284). D'un autre côté, le polymorphisme TLR3 L412F, caractérisé par un défaut d'activation de ce récepteur, est associé à une fibro-prolifération anormale et une accélération de la fibrose pulmonaire idiopathique (285). Finalement, le TLR3 préserve l'intégrité vasculaire au cours des phases précoces d'athérosclérose (286).

Afin d'interagir avec les TLRs endosomaux, tels que le TLR3, le TLR7 et le TLR8, les ARNe doivent être endocytés. Lövgren et al. ont constaté que les complexes ARNe/auto-anticorps sont internalisés par les cellules dendritiques plasmacytoïdes via les récepteurs FcγRII dans le lupus érythémateux disséminé (287). D'autres études ont révélé que la liaison des ARNe au peptide antimicrobien LL-37 facilite leur interaction avec les protéoglycanes composant le glycocalyx cellulaire et leur endocytose (288) (289). Lee et al. ont montré que la protéine CD14 exprimée par les cellules mononucléaires du sang périphérique, favorise l'internalisation du poly(I:C) et potentialise l'activation intracellulaire de TLR3 (290). Comme le mécanisme

d'endocytose n'a pas été étudié au cours de ma thèse, il serait donc intéressant d'identifier par spectrométrie de masse la molécule permettant l'endocytose des ARNe et leur interaction avec le TLR3 endothélial. L'endocytose médiée par la clathrine favorise l'internalisation non seulement des ARN à double brin et du poly(I:C), mais aussi des lipoprotéines de basse densité et de la transferrine (291) (292). Contrairement aux auto-anticorps, au peptide antimicrobien LL-37 et à la protéine CD14, les oligonucléotides à simple brin, ssRNA (*single stranded RNA*) et ssDNA (*single stranded DNA*), régulent l'activation du système immunitaire en altérant l'endocytose médiée par la clathrine. Il a été démontré que les oligonucléotides à simple brin inhibent l'activation du TLR3 et du TLR7 et modulent celle du TLR4 au niveau des cellules mononucléaires du sang périphérique (293). D'autres molécules telles que CYLD, A20, USP4, USP25, OTUB1/2, DUBA, et MYSM1 pourraient également contrôler les voies de signalisation des PRRs et limiter l'activation excessive de l'immunité innée (294).

Jusqu'à présent, je n'ai pas caractérisé la nature des ARNe libérés in vivo suite aux dommages cellulaires. Cependant, mes expériences in vitro et in vivo montrent au moins que les ARNm sont capables d'activer le TLR3. En effet, les cellules HUVECs et les souris ont été traitées avec de l'ARN obtenu à partir des cellules HEK 293 ou des cellules endothéliales murines, à l'aide d'un kit d'extraction. Les ARNm sont des ARN à simple brin reconnus par le TLR3 en raison de la présence de structures secondaires telles que des régions à double brin (253). D'autre part, les récepteurs TLR3 et TLR10 entrent en compétition pour la liaison des ARN à double brin. Ainsi, le TLR10 réduit l'expression du gène cible de TLR3, l'IFN- $\beta$ , par plusieurs mécanismes. En effet, le recrutement de la molécule adaptatrice MyD88 par TLR10, diminue la phosphorylation d'IRF7 (*Interferon regulatory factor 7*) et réprime l'expression d'IFN- $\beta$ . De plus, la séquestration du ligand par TLR10 et l'induction du régulateur négatif de la voie de signalisation de TLR3, SARM1 (*Sterile alpha and TIR motif containing 1*), inhibent d'avantage l'expression d'IFN- $\beta$ . Étant donné que le TLR10 est un pseudogène et que l'approche d'inactivation génique (knock-out) n'est pas possible, nous pourrions analyser in vivo la capacité de TLR10 à inhiber l'activité prothrombotique de TLR3 en ayant recours à l'insertion génique (knock-in) (295). À ce jour, le TLR9 reconnaissant les ADN extracellulaires, est le seul TLR étudié dans la MVTE. Henke et al. ont montré que la déficience en TLR9 in vivo s'accompagne d'une augmentation des paramètres de coagulation et d'une diminution des cytokines de type Th1, qui sont à l'origine du retard de la résorption du thrombus (263). Bien que Huang et al. aient observé un effet synergique des récepteurs TLR3 et TLR9 exprimés par les microglies et les macrophages dans la suppression tumorale, il semble que ces récepteurs

exercer des actions opposées dans la MVTE (296). Comme les récepteurs TLR3 et TLR9 semblent être respectivement pro-thrombotiques et anti-thrombotiques, il serait donc intéressant de combiner l'inhibition de TLR3 avec la surexpression de TLR9 et d'analyser l'effet de cette association sur la thrombogenèse et la thromolyse.

Dans mon article, j'ai décrypté les mécanismes de formation du thrombus veineux médiés par le TLR3. En manipulant l'expression du TLR3 au niveau des HUVECs, j'ai démontré d'une manière spécifique le rôle du TLR3 endothélial dans la MVTE. In vivo, j'ai pu caractériser le rôle du TLR3 dans la thrombose veineuse en réponse à l'ARNe. En revanche, l'utilisation dans mon travail, de souris totalement déficientes en TLR3 (TLR3<sup>-/-</sup>) ne permet pas de confirmer le rôle du TLR3 endothélial dans la MVTE in vivo. C'est pourquoi, l'utilisation des souris transgéniques Cdh5-Cre, qui sont sélectivement déficientes en TLR3 au niveau des cellules endothéliales, permettrait de poursuivre la caractérisation du mécanisme prothrombotique de TLR3. Dans ce modèle, l'expression de la Cre recombinase est sous le contrôle du promoteur de Cdh5. Ce dernier code pour la VE-cadhérine qui est spécifiquement exprimée par toutes les cellules endothéliales (297) (298).

Cependant, le TLR3 est un récepteur exprimé de manière ubiquitaire par les monocytes, les macrophages, les mastocytes et les cellules NK (245). Il est donc possible que le TLR3 exprimé par d'autres types cellulaires impliqués dans la MVTE contribue également au phénotype prothrombotique. Pour déterminer le rôle du TLR3 monocyttaire dans la MVTE in vivo, nous pourrions transférer des monocytes contrôles ou déficients en TLR3 à des souris n'exprimant pas ce récepteur au niveau des cellules myéloïdes (TLR3<sup>fl/fl</sup> LysM<sup>Cre+/+</sup>), puis leur induire la thrombose veineuse. Si la déficience en TLR3 au niveau des cellules myéloïdes est associée à une réduction de la taille du thrombus, ce résultat suggérerait l'importance du TLR3 exprimé par les cellules myéloïdes dans la thrombogenèse. Au cas où le transfert des monocytes contrôles et non pas ceux déficients en TLR3 restaure la taille du thrombus, nous pourrions vérifier le rôle prothrombotique du TLR3 monocyttaire. Les monocytes jouent un rôle crucial dans la MVTE, en activant la voie extrinsèque de coagulation via l'expression du facteur tissulaire. Afin de déterminer l'effet du TLR3 monocyttaire sur l'expression du facteur tissulaire, nous pourrions analyser l'expression d'ARNm de ce gène par RT-PCR en temps réel au niveau des monocytes transfectés avec un siRNA CTR ou un siRNA dirigé contre le TLR3. Les cellules NK, quant à elles, participent à la MVTE en augmentant la NETose à travers la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (113). Pour identifier l'effet du TLR3 exprimé par les cellules NK sur la modulation de la NETose, nous pourrions réaliser des co-cultures de cellules NK contrôles ou

déficientes en TLR3 avec des neutrophiles, puis quantifier la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et la NETose par ELISA et immunofluorescence, respectivement.

En plus des monocytes et des neutrophiles, les mastocytes contribuent à la MVTE en favorisant la libération de vWF et le recrutement des plaquettes via le relargage de médiateurs pro-inflammatoires, en particulier l'histamine (111). D'autre part, Kulka et al. ont montré que la stimulation des mastocytes humains avec du poly(I:C) s'accompagne d'une diminution d'adhésion des mastocytes aux protéines de la matrice extracellulaire, notamment la vitronectine et la fibronectine, ainsi qu'une réduction de leur dégranulation (299). Ces résultats pourraient suggérer un effet anti-thrombotique du TLR3 exprimé par les mastocytes. Pour évaluer le rôle du TLR3 mastocytaire dans la MVTE, nous pourrions transférer des mastocytes exprimant ou non le TLR3 à des souris déficientes en mastocytes ( $\text{Kit}^{\text{W-sh}}$ ) avant l'induction de la thrombose veineuse. Il faudra ensuite évaluer la taille du thrombus, la dégranulation mastocytaire, l'adhésion plaquettaire et le taux plasmatique de vWF chez ces souris. Outre la régulation de la dégranulation, l'activation du TLR3 mastocytaire favorise le recrutement des lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  en augmentant la production de cytokines et de chimiokines (300). Dans la MVTE, il a été révélé que les lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  accélèrent la résorption du thrombus en augmentant l'infiltration des macrophages, l'activité de la MMP-9 et l'expression protéique d'uPA (180). Il serait donc probable que le TLR3 mastocytaire contribue à la résorption du thrombus en facilitant le recrutement des lymphocytes T  $\text{CD8}^+$ .

Comme exposée dans l'introduction, la formation du thrombus s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules nécrotiques et apoptotiques. En plus de leur rôle dans la résorption du thrombus veineux, les macrophages pourraient participer à la résolution de l'inflammation en facilitant la clairance des débris cellulaires via les mécanismes d'efférocytose et de phagocytose. L'efférocytose est un mécanisme cellulaire favorisant l'élimination des cellules apoptotiques par des phagocytes « professionnels » comme les macrophages ou « non professionnels », tels que les cellules endothéliales (301). Bien que l'efférocytose ne soit pas encore étudiée dans la MVTE, elle est modulée par le TLR3 dans les infections bactériennes. V. Suresh et al. ont constaté une amélioration de l'activité des macrophages contre la pneumonie en l'absence de TLR3. En effet, une augmentation d'efférocytose est observée au niveau des macrophages murins  $\text{TLR3}^{-/-}$  par rapport aux contrôles (302). D'autre part, Deng et al. ont remarqué une réduction de la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages exprimant le TLR3 (303). Il est donc possible

que le TLR3 exprimé par les macrophages retarde la résolution de l'inflammation dans la MVTE en atténuant l'efférocytose.

En utilisant la technique de Boyden Chamber, j'ai montré que le poly(I:C) active le TLR3 endothélial, induisant la sécrétion d'IL-8. Cette cytokine chimiotactique contribue au recrutement des neutrophiles en se liant au récepteur CXCR2. Néanmoins, ce dernier n'est pas seulement exprimé par les neutrophiles, mais aussi par d'autres cellules immunitaires comme les mastocytes, les monocytes et les macrophages (304). Ainsi, nous pourrions étudier *in vitro* l'effet d'IL-8 généré par l'axe ARNe/TLR3 endothélial sur la migration des mastocytes, des monocytes et des macrophages. Pour valider le rôle de l'IL-8 chez la souris, j'ai mis en évidence *in vitro* l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'un des homologues murins de l'IL-8, le CXCL5, au niveau des cellules endothéliales murines exprimant le TLR3 et traitées avec du poly(I:C) et de l'ARNe. Afin de confirmer ces données *in vivo*, nous pourrions doser la concentration plasmatique de cette cytokine chez des souris contrôles et TLR3<sup>-/-</sup>, traitées avec du véhicule, du poly(I:C) ou de l'ARNe. Nous pourrions nous attendre à une augmentation de la concentration plasmatique de CXCL5 chez les souris contrôles traitées avec du poly(I:C) ou de l'ARNe par rapport à celles recevant du véhicule. Par contre, aucune modification du taux plasmatique de CXCL5 ne sera observée chez les souris TLR3<sup>-/-</sup>, quel que soit le traitement. En vue de caractériser l'activité fonctionnelle de CXCL5 *in vivo*, nous pourrions administrer aux souris contrôles préalablement traitées avec du véhicule, du poly(I:C) ou de l'ARNe, un anticorps anti-CXCL5 ou un isotype contrôle. Il faudrait ensuite analyser le recrutement des neutrophiles par immunofluorescence ou en temps réel par microscopie intravitale et mesurer la taille du thrombus par échographie-doppler. L'injection de l'isotype contrôle aux souris traitées avec du poly(I:C) ou de l'ARNe s'accompagnera d'une augmentation de l'infiltration des neutrophiles et de la taille du thrombus, par rapport à celles recevant du véhicule. Comparé à l'isotype contrôle, l'anticorps anti-CXCL5 réduira la taille du thrombus et l'accumulation des neutrophiles. L'induction de la thrombose à des souris déficientes en CXCL5 (CXCL5<sup>-/-</sup>) ou en son récepteur CXCR2 (CXCR2<sup>-/-</sup>) pourrait être une alternative à l'inhibition pharmacologique de cette chimiokine.

À l'aide de la technique de turbidimétrie, j'ai montré *in vitro* que l'ARNe amplifie la coagulation en réduisant l'expression du TFPI. Pour démontrer que l'effet procoagulant de l'ARNe est médié par le TLR3, il faudrait évaluer la formation de fibrine et l'expression du TFPI au niveau des HUVECs transfectées avec un siRNA dirigé contre le TLR3 et traitées avec du véhicule, du poly(I:C) ou de l'ARNe. Le TFPI est une glycoprotéine anticoagulante de la



famille des inhibiteurs de protéases à sérine de type Kunitz, qui est présente sous deux isoformes majoritaires  $\alpha$  et  $\beta$ . Le TFPI $\alpha$  exerce son effet anticoagulant en interagissant avec les sites catalytiques des facteurs VIIa et Xa, par l'intermédiaire de ses domaines respectifs K1 et K2. Chez l'homme, nous distinguons trois pools de TFPI : vasculaire, plasmatique et plaquettaire. Le TFPI vasculaire associé à la surface endothéliale représente 80% du TFPI. Quant aux pools plasmatique et plaquettaire, ils constituent respectivement 15% et 5% du TFPI (68). Afin de déterminer l'effet de l'axe ARNe/TLR3 sur l'activité du TFPI, nous pourrions utiliser un test chromogène. Il faudra tout d'abord transfecter les HUVECs avec un siRNA CTR ou un siRNA dirigé contre le TLR3 et les traiter avec du véhicule, du poly(I:C) ou de l'ARNe. Ces cellules seront ensuite incubées avec du plasma humain en présence du FXa, puis traitées avec de l'héparine ou de la thrombine pour mobiliser le TFPI contenu dans les granules endothéliaux (305) (306). Après un temps d'incubation suffisant, le complexe inactif TF/FVIIa/TFPI/FXa sera formé (Réaction 1). L'activité catalytique résiduelle du complexe TF/FVIIa sera mesurée en ajoutant le FX (Réaction 2) et un substrat chromogène, BIOPHEN CS-11(22) (Réaction 3).

- Réaction 1 : TF/FVIIa + TFPI + Xa  $\rightarrow$  TF/FVIIa/TFPI/FXa + TF/FVIIa (complexe résiduel)
- Réaction 2 : TF/FVIIa (complexe résiduel) + FX  $\rightarrow$  FXa
- Réaction 3 : Bz-Ile Glu-Gly-Arg-pNA + H<sub>2</sub>O + FXa  $\rightarrow$  Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-OH + pNA

Nous pourrions nous attendre à une diminution du TFPI au niveau des cellules exprimant le TLR3 et traitées avec du poly(I:C) ou de l'ARNe, par rapport au véhicule. La réduction du TFPI entraînera une diminution du complexe inactif TF/FVIIa/TFPI/FXa. Il en résulte une augmentation du complexe résiduel responsable de l'activation du FX. Ainsi, le FXa catalysera la conversion du substrat chromogène en un précipité coloré.

Dans ma thèse, j'ai étudié le rôle du TLR3 dans la formation du thrombus. En vue d'identifier la contribution du TLR3 à la phase de résorption, il serait possible d'induire la thrombose veineuse en utilisant le modèle de stase et d'évaluer la taille du thrombus ainsi que les paramètres de fibrinolyse à plusieurs jours voire plusieurs semaines après la formation du thrombus. Royer et al. ont démontré que le TLR3 favorise la production de la MMP-9 au niveau des cellules épithéliales des voies respiratoires, via la voie Wnt/  $\beta$ -caténine (307). D'autre part, Ishibashi et al. ont révélé que la déficience en TLR3 s'accompagne d'une réduction de l'activité de la MMP-2 et de la MMP-9 au niveau des plaques athéromateuses (308). Une autre équipe a

remarqué que le TLR3 augmente l'expression d'urokinase par les hépatocytes suite à une hépatectomie partielle (309). Ainsi, nous pourrions suggérer que le TLR3 pourrait accélérer la résorption du thrombus en favorisant la dégradation du collagène par les métalloprotéases et en stimulant la fibrinolyse via l'urokinase. En revanche, d'autres études ont constaté que le TLR3 atténue la fibrinolyse en augmentant l'expression de PAI-1 au niveau des cellules endothéliales glomérulaires et mésothéliales (310) (311). Quant à l'activité angiogénique, il a été démontré que le TLR3 pourrait promouvoir ou réprimer la néovascularisation. Par exemple, le TLR3 inhibe la migration des cellules endothéliales via la phosphorylation de la protéine tyrosine kinase Src, indépendamment de la signalisation de TRIF, TRAF3, MyD88 et IRF3 (312). De plus, il inhibe l'angiogénèse et la migration des HUVECs et contribue à leur apoptose (313). Ce récepteur exerce également une activité anti-angiogénique en inhibant la néovascularisation cornéenne (314). Le TLR3 pourrait donc retarder la résorption du thrombus en inhibant l'angiogénèse. En revanche, le TLR3 pourrait participer à la néovascularisation comme dans le cas du traitement des membres ischémiques par ondes de choc extracorporelles. En effet, cette procédure induit la libération de l'ARN cytoplasmique sans provoquer des dommages cellulaires. Cet ARN va activer l'angiogénèse via le TLR3, améliorant ainsi la perfusion sanguine (315). En vue de déterminer les mécanismes par lesquels le TLR3 accélère ou retarde la résorption du thrombus, il faudrait évaluer l'expression ainsi que l'activité des métalloprotéases matricielles, des activateurs du plasminogène et des facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF.

Outre son activité chimiotactique, CXCL5 joue un rôle crucial dans l'angiogénèse. En effet, Chen et al. ont révélé que CXCL5 induit l'angiogénèse tumorale en amplifiant l'expression de FOXD1 médiée par la voie AKT/NFκB dans le cancer colorectal (316). Il serait donc pertinent d'étudier l'activité angiogénique de CXCL5 dans la MVTE et son effet sur la résorption du thrombus. En plus de l'étude du TLR3 dans la phase de résorption, nous pourrions analyser sa contribution à la récurrence de la MVTE. Pour cela, il faudrait tout d'abord induire à des souris contrôles un premier événement de thrombose en utilisant le modèle électrolytique. Le thrombus formé atteindra sa taille maximale à J2 et se résorbera au bout de 21 jours. À ce moment, nous pourrions induire un deuxième événement de thrombose, en utilisant le modèle de stase ou de sténose (24). Pour étudier le rôle du TLR3 dans la récurrence, il faudrait manipuler le TLR3 entre les deux événements de thrombose en administrant aux souris un siRNA CTR ou un siRNA TLR3. Si le second thrombus des souris traitées avec un siRNA TLR3 est plus

petit que celui des souris recevant un siRNA CTR, ce résultat suggère un rôle du TLR3 dans la récurrence de la MVTE.

De point de vue clinique, une étude a montré une augmentation des nucléosomes circulants et des marqueurs d'activation des neutrophiles (élastase- $\alpha$ 1-antitrypsine et MPO) chez les patients avec TVP par rapport à des sujets témoins (137). En plus des NETs, il serait intéressant de mesurer les concentrations plasmatiques des ARNe chez des sujets témoins et des patients avec TVP. S'il existe une corrélation entre les ARNe et la survenue de la TVP, les ARNe pourraient être utilisés comme un nouveau biomarqueur de la TVP. D'autre part, E van Aken et al. ont dosé les concentrations plasmatiques de l'homologue humain de CXCL5, l'IL-8, chez des patients et des sujets témoins de l'étude LETS (*Leiden Thrombophilia Study*). Les concentrations d'IL-8 étaient faiblement corrélées avec l'âge, le sexe masculin, l'activité du FVIII et les concentrations de la protéine C-réactive et de l'homocystéine. Par contre, E van Aken et al. ont constaté que les taux élevés d'IL-8 étaient associés à un risque accru de thrombose (317). Cette cytokine pro-inflammatoire a été également identifiée comme un facteur de risque de la récurrence de la TVP (318). D'un autre côté, l'ARNase 1 émerge comme une nouvelle stratégie thérapeutique dans plusieurs pathologies cardiovasculaires. Plusieurs études précliniques ont montré l'efficacité de l'ARNase 1 dans la réduction de la thrombose veineuse, artérielle, l'infarctus du myocarde et la plaque athéromateuse (238) (235) (234). Comme l'ARNase 1 est déjà contenue dans les granules endothéliaux, il serait plus pertinent de mobiliser cette enzyme vers la circulation systémique via la procédure RIPC (*Remote Ischemic Preconditioning*) par exemple, que d'administrer de l'ARNase 1 exogène aux patients (319). Le préconditionnement ischémique consiste en une amélioration de la tolérance à l'ischémie par de brefs épisodes d'occlusion du flux suivis de périodes de reperfusion (320). En effet, A Cabrera-Fuentes et al. ont montré une augmentation de la concentration d'ARNase 1 endogène chez des patients ayant subi une chirurgie cardiaque avec RIPC, par rapport à ceux qui ont été opérés sans RIPC. Ainsi, cette enzyme libérée confère une cardioprotection aux patients en réduisant les taux d'ARNe et de TNF- $\alpha$  (321).

Les mécanismes pro-inflammatoires induits par le TLR3 et d'autres composants du système immunitaire inné pourraient contribuer aux complications chroniques de la MVTE, telles que l'HTP-TEC, le SPT et la récurrence, via l'activation du système immunitaire adaptatif. Comme les données concernant l'immunité adaptative dans la MVTE sont limitées, j'ai mis en place un nouveau projet visant à caractériser les sous-types de lymphocytes B et T au cours du temps. Les cellules CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>, CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub>, CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> et CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> semblent être augmentées au niveau

de la rate et du sang des souris à J7 par rapport à J2, en utilisant le modèle de stase. Luther et al. ont constaté une augmentation du taux de cellules T au niveau du thrombus au cours du temps avec une valeur maximale atteinte à J21. De plus, ils ont observé une accumulation des cellules T<sub>EM</sub> au niveau de la paroi veineuse à J2 en utilisant le modèle de sténose (181). Cependant, ils n'ont analysé qu'à J2 les cellules T mémoires au niveau du thrombus, de la paroi veineuse, du sang et de la rate. D'où, l'importance de mon projet qui permet d'évaluer les cellules T mémoires au cours du temps. D'autre part, il serait intéressant d'ajouter un panel permettant d'étudier les cellules immunitaires au niveau de la paroi veineuse, notamment les cellules T mémoires résidentes qui constituent la population la plus nombreuse parmi les cellules T mémoires (199).

D'un autre côté, les cellules B mémoires CD73<sup>+</sup> semblent être augmentées au niveau du sang et de la moelle osseuse à J7 par rapport à J2. Bien que ces cellules ressemblent plus aux cellules B naïves, elles commencent à acquérir le phénotype B mémoire. Il se peut qu'au cours du temps, ces cellules se différencient en cellules B CD80<sup>high</sup> PDL2<sup>high</sup> CD73<sup>high</sup> présentant des taux élevés de commutations isotypiques et de mutations somatiques (277). Pour le moment, aucune différence n'est observée au niveau du taux de cellules B2 entre J2 et J7. Les plasmocytes qui ont l'air d'être augmentés à J7 sont probablement des plasmocytes à durée de vie courte générés indépendamment du centre germinatif. D'autre part, l'augmentation des cellules B de la zone marginale et non pas les cellules B folliculaires à J7, reflète l'activation de la réponse humorale thymo-indépendante.

Finalement, mon travail de thèse portant sur le rôle de l'inflammation dans la MVTE a permis d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche afin d'identifier des biomarqueurs ou des cibles thérapeutiques innovantes pour prévenir ou traiter les phases aiguës de la MVTE ainsi que ses complications chroniques.

## Références bibliographiques

1. Wolberg AS, Rosendaal FR, Weitz JI, Jaffer IH, Agnelli G, Baglin T, et al. Venous thrombosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 07;1:15006.
2. Heit JA. Epidemiology of venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol*. 2015 Aug;12(8):464–74.
3. Reitsma PH, Versteeg HH, Middeldorp S. Mechanistic view of risk factors for venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Mar;32(3):563–8.
4. Konstantinides SV, Meyer G, Becattini C, Bueno H, Geersing GJ, Harjola VP, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS): The Task Force for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Respir J*. 2019 Sep;54(3):1901647.
5. Vazquez SR, Kahn SR. Postthrombotic Syndrome. *Circulation* [Internet]. 2010 Mar 2 [cited 2022 Apr 1];121(8). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.925651>
6. Huisman MV, Barco S, Cannegieter SC, Le Gal G, Konstantinides SV, Reitsma PH, et al. Pulmonary embolism. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Jun 7;4(1):18028.
7. Agnelli G, Buller HR, Cohen A, Curto M, Gallus AS, Johnson M, et al. Apixaban for extended treatment of venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2013 Feb 21;368(8):699–708.
8. Coppens M, Eikelboom JW, Gustafsson D, Weitz JI, Hirsh J. Translational Success Stories: Development of Direct Thrombin Inhibitors. *Circ Res*. 2012 Sep 14;111(7):920–9.
9. Yeh CH, Fredenburgh JC, Weitz JI. Oral Direct Factor Xa Inhibitors. *Circ Res*. 2012 Sep 28;111(8):1069–78.
10. Olsson SB, Executive Steering Committee of the SPORTIF III Investigators. Stroke prevention with the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran compared with warfarin in patients with non-valvular atrial fibrillation (SPORTIF III): randomised controlled trial. *Lancet*. 2003 Nov 22;362(9397):1691–8.
11. Albers GW, Diener HC, Frison L, Grind M, Nevinson M, Partridge S, et al. Ximelagatran vs warfarin for stroke prevention in patients with nonvalvular atrial fibrillation: a randomized trial. *JAMA*. 2005 Feb 9;293(6):690–8.
12. Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E, Stangier J, Roth W. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab Dispos*. 2008 Feb;36(2):386–99.

13. Weinz C, Schwarz T, Kubitzka D, Mueck W, Lang D. Metabolism and Excretion of Rivaroxaban, an Oral, Direct Factor Xa Inhibitor, in Rats, Dogs, and Humans. *Drug Metab Dispos.* 2009 May;37(5):1056–64.
14. Raghavan N, Frost CE, Yu Z, He K, Zhang H, Humphreys WG, et al. Apixaban Metabolism and Pharmacokinetics after Oral Administration to Humans. *Drug Metab Dispos.* 2009 Jan;37(1):74–81.
15. Bathala MS, Masumoto H, Oguma T, He L, Lowrie C, Mendell J. Pharmacokinetics, Biotransformation, and Mass Balance of Edoxaban, a Selective, Direct Factor Xa Inhibitor, in Humans. *Drug Metab Dispos.* 2012 Dec;40(12):2250–5.
16. Chan NC, Eikelboom JW, Weitz JI. Evolving Treatments for Arterial and Venous Thrombosis: Role of the Direct Oral Anticoagulants. *Circ Res.* 2016 Apr 29;118(9):1409–24.
17. Kearon C, Akl EA, Comerota AJ, Prandoni P, Bounameaux H, Goldhaber SZ, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2012 Feb;141(2 Suppl):e419S–e496S.
18. Schulman S, Kearon C, Kakkar AK, Mismetti P, Schellong S, Eriksson H, et al. Dabigatran versus warfarin in the treatment of acute venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2009 Dec 10;361(24):2342–52.
19. Schulman S, Kakkar AK, Goldhaber SZ, Schellong S, Eriksson H, Mismetti P, et al. Treatment of acute venous thromboembolism with dabigatran or warfarin and pooled analysis. *Circulation.* 2014 Feb 18;129(7):764–72.
20. Hokusai-VTE Investigators, Büller HR, Décousus H, Grosso MA, Mercuri M, Middeldorp S, et al. Edoxaban versus warfarin for the treatment of symptomatic venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2013 Oct 10;369(15):1406–15.
21. EINSTEIN Investigators, Bauersachs R, Berkowitz SD, Brenner B, Buller HR, Decousus H, et al. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2010 Dec 23;363(26):2499–510.
22. Agnelli G, Buller HR, Cohen A, Curto M, Gallus AS, Johnson M, et al. Oral apixaban for the treatment of acute venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2013 Aug 29;369(9):799–808.
23. Diaz JA, Obi AT, Myers DD, Wroblewski SK, Henke PK, Mackman N, et al. Critical review of mouse models of venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Mar;32(3):556–62.
24. Diaz JA, Saha P, Cooley B, Palmer OR, Grover SP, Mackman N, et al. Choosing a Mouse Model of Venous Thrombosis: A Consensus Assessment of Utility and Application. *ATVB.* 2019 Mar;39(3):311–8.

25. Patterson KA, Zhang X, Wroblewski SK, Hawley AE, Lawrence DA, Wakefield TW, et al. Rosuvastatin reduced deep vein thrombosis in ApoE gene deleted mice with hyperlipidemia through non-lipid lowering effects. *Thromb Res.* 2013 Mar;131(3):268–76.
26. Myers D, Farris D, Hawley A, Wroblewski S, Chapman A, Stoolman L, et al. Selectins Influence Thrombosis in a Mouse Model of Experimental Deep Venous Thrombosis. *Journal of Surgical Research.* 2002 Dec;108(2):212–21.
27. Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG, et al. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg.* 2003 Nov;38(5):1075–89.
28. Wojcik BM, Wroblewski SK, Hawley AE, Wakefield TW, Myers DD, Diaz JA. Interleukin-6: a potential target for post-thrombotic syndrome. *Ann Vasc Surg.* 2011 Feb;25(2):229–39.
29. Diaz JA, Ballard-Lipka NE, Farris DM, Hawley AE, Wroblewski SK, Myers DD, et al. Impaired fibrinolytic system in ApoE gene-deleted mice with hyperlipidemia augments deep vein thrombosis. *Journal of Vascular Surgery.* 2012 Mar;55(3):815–22.
30. DeRoo EP, Wroblewski SK, Shea EM, Al-Khalil RK, Hawley AE, Henke PK, et al. The role of galectin-3 and galectin-3-binding protein in venous thrombosis. *Blood.* 2015 Mar 12;125(11):1813–21.
31. Singh I, Smith A, Vanzielegem B, Collen D, Burnand K, Saint-Remy JM, et al. Antithrombotic effects of controlled inhibition of factor VIII with a partially inhibitory human monoclonal antibody in a murine vena cava thrombosis model. *Blood.* 2002 May 1;99(9):3235–40.
32. Singh I, Burnand KG, Collins M, Luttun A, Collen D, Boelhouwer B, et al. Failure of thrombus to resolve in urokinase-type plasminogen activator gene-knockout mice: rescue by normal bone marrow-derived cells. *Circulation.* 2003 Feb 18;107(6):869–75.
33. Modarai B, Burnand KG, Sawyer B, Smith A. Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi. *Circulation.* 2005 May 24;111(20):2645–53.
34. Modarai B, Humphries J, Gossage JA, Waltham M, Burnand KG, Kanaganayagam GS, et al. Adenovirus-Mediated VEGF Gene Therapy Enhances Venous Thrombus Recanalization and Resolution. *ATVB.* 2008 Oct;28(10):1753–9.
35. Evans CE, Humphries J, Mattock K, Waltham M, Wadoodi A, Saha P, et al. Hypoxia and Upregulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  Stimulate Venous Thrombus Recanalization. *ATVB.* 2010 Dec;30(12):2443–51.
36. Evans CE, Grover SP, Humphries J, Saha P, Patel AP, Patel AS, et al. Antiangiogenic Therapy Inhibits Venous Thrombus Resolution. *ATVB.* 2014 Mar;34(3):565–70.
37. Saha P, Andia ME, Modarai B, Blume U, Humphries J, Patel AS, et al. Magnetic Resonance T<sub>1</sub> Relaxation Time of Venous Thrombus Is Determined by Iron Processing and Predicts Susceptibility to Lysis. *Circulation.* 2013 Aug 13;128(7):729–36.

38. Andia ME, Saha P, Jenkins J, Modarai B, Wiethoff AJ, Phinikaridou A, et al. Fibrin-Targeted Magnetic Resonance Imaging Allows In Vivo Quantification of Thrombus Fibrin Content and Identifies Thrombi Amenable for Thrombolysis. *ATVB*. 2014 Jun;34(6):1193–8.
39. Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, Yang JJ, De Meyer SF, Köllnberger M, et al. von Willebrand factor–mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1400–7.
40. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012 Apr 9;209(4):819–35.
41. Payne H, Ponomaryov T, Watson SP, Brill A. Mice with a deficiency in CLEC-2 are protected against deep vein thrombosis. *Blood*. 2017 Apr 6;129(14):2013–20.
42. Geddings J, Aleman MM, Wolberg A, von Brühl ML, Massberg S, Mackman N. Strengths and weaknesses of a new mouse model of thrombosis induced by inferior vena cava stenosis: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2014 Apr;12(4):571–3.
43. Diaz J, Hawley A, Alvarado C, Berguer A, Baker N, Wroblewski S, et al. Thrombogenesis with continuous blood flow in the inferior vena cava: A novel mouse model. *Thromb Haemost*. 2010;104(08):366–75.
44. Diaz JA, Wroblewski SK, Hawley AE, Lucchesi BR, Wakefield TW, Myers DD. Electrolytic inferior vena cava model (EIM) of venous thrombosis. *J Vis Exp*. 2011 Jul 12;(53):e2737.
45. Diaz JA, Alvarado CM, Wroblewski SK, Slack DW, Hawley AE, Farris DM, et al. The electrolytic inferior vena cava model (EIM) to study thrombogenesis and thrombus resolution with continuous blood flow in the mouse. *Thromb Haemost*. 2013;109(06):1158–69.
46. Banno F, Kita T, Fernández JA, Yanamoto H, Tashima Y, Kokame K, et al. Exacerbated venous thromboembolism in mice carrying a protein S K196E mutation. *Blood*. 2015 Nov 5;126(19):2247–53.
47. Palmer OR, Shaydakov ME, Rainey JP, Lawrence DA, Greve JM, Diaz JA. Update on the electrolytic IVC model for pre-clinical studies of venous thrombosis. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018 Apr;2(2):266–73.
48. Wang X, Smith PL, Hsu MY, Ogletree ML, Schumacher WA. Murine model of ferric chloride-induced vena cava thrombosis: evidence for effect of potato carboxypeptidase inhibitor. *J Thromb Haemost*. 2006 Feb;4(2):403–10.
49. Wang X, Smith PL, Hsu MY, Tamasi JA, Bird E, Schumacher WA. Deficiency in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) protected mice from ferric chloride-induced vena cava thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2007 Feb 12;23(1):41–9.
50. Cooley BC. In Vivo Fluorescence Imaging of Large-Vessel Thrombosis in Mice. *ATVB*. 2011 Jun;31(6):1351–6.



51. Cooley BC, Herrera AJ. Cross-modulatory effects of clopidogrel and heparin on platelet and fibrin incorporation in thrombosis. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2013 Sep;24(6):593–8.
52. Maroney SA, Cooley BC, Ferrel JP, Bonesho CE, Mast AE. Murine Hematopoietic Cell Tissue Factor Pathway Inhibitor Limits Thrombus Growth. *ATVB*. 2011 Apr;31(4):821–6.
53. Maroney SA, Cooley BC, Ferrel JP, Bonesho CE, Nielsen LV, Johansen PB, et al. Absence of hematopoietic tissue factor pathway inhibitor mitigates bleeding in mice with hemophilia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Mar 6;109(10):3927–31.
54. Smith SA, Choi SH, Collins JNR, Travers RJ, Cooley BC, Morrissey JH. Inhibition of polyphosphate as a novel strategy for preventing thrombosis and inflammation. *Blood*. 2012 Dec 20;120(26):5103–10.
55. Kuether EL, Schroeder JA, Fahs SA, Cooley BC, Chen Y, Montgomery RR, et al. Lentivirus-mediated platelet gene therapy of murine hemophilia A with pre-existing anti-factor VIII immunity: Gene therapy of hemophilia A with inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012 Aug;10(8):1570–80.
56. Zhi H, Rauova L, Hayes V, Gao C, Boylan B, Newman DK, et al. Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood*. 2013 Mar 7;121(10):1858–67.
57. Aleman MM, Walton BL, Byrnes JR, Wang JG, Heisler MJ, Machlus KR, et al. Elevated Prothrombin Promotes Venous, but Not Arterial, Thrombosis in Mice. *ATVB*. 2013 Aug;33(8):1829–36.
58. Andraska E, Luke C, Elflin M, Henke S, Madapoosi S, Metz A, et al. Pre-Clinical Model to Study Recurrent Venous Thrombosis in the Inferior Vena Cava. *Thromb Haemost*. 2018 Jun;118(06):1048–57.
59. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014 May 1;123(18):2759–67.
60. Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. 2011 Apr;11(4):264–74.
61. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol*. 2019 Mar;16(3):166–79.
62. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):327–58.
63. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008 Aug 28;359(9):938–49.
64. Madhusudhan T, Kerlin BA, Isermann B. The emerging role of coagulation proteases in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2016 Feb;12(2):94–109.

65. Oliver JJ, Webb DJ, Newby DE. Stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Dec;25(12):2470–9.
66. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jan;13(1):34–45.
67. Marshall JC. Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 May;2(5):391–405.
68. Mast AE. Tissue Factor Pathway Inhibitor: Multiple Anticoagulant Activities for a Single Protein. *ATVB.* 2016 Jan;36(1):9–14.
69. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jul;25(7):1311–20.
70. Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood.* 2019 28;133(9):906–18.
71. Achneck HE, Sileshi B, Parikh A, Milano CA, Welsby IJ, Lawson JH. Pathophysiology of Bleeding and Clotting in the Cardiac Surgery Patient: From Vascular Endothelium to Circulatory Assist Device Surface. *Circulation.* 2010 Nov 16;122(20):2068–77.
72. Lipe B, Ornstein DL. Deficiencies of natural anticoagulants, protein C, protein S, and antithrombin. *Circulation.* 2011 Oct 4;124(14):e365-368.
73. Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJM, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA.* 2008 Mar 19;299(11):1306–14.
74. Potente M, Mäkinen T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Aug;18(8):477–94.
75. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Mar;10(3):165–77.
76. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell.* 2009 Feb;16(2):209–21.
77. Otsuka F, Finn AV, Yazdani SK, Nakano M, Kolodgie FD, Virmani R. The importance of the endothelium in atherothrombosis and coronary stenting. *Nat Rev Cardiol.* 2012 May 22;9(8):439–53.
78. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006 Jan;86(1):279–367.
79. Nava E, Llorens S. The Local Regulation of Vascular Function: From an Inside-Outside to an Outside-Inside Model. *Front Physiol.* 2019;10:729.

80. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):829–37, 837a–837d.
81. Lau EMT, Giannoulatou E, Celermajer DS, Humbert M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2017 Oct;14(10):603–14.
82. Remuzzi G, Perico N, Benigni A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Dec;1(12):986–1001.
83. Pilard M, Ollivier EL, Gourdou-Latyszenok V, Couturaud F, Lemarié CA. Endothelial Cell Phenotype, a Major Determinant of Venous Thrombo-Inflammation. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:864735.
84. Colling ME, Tourdot BE, Kanthi Y. Inflammation, Infection and Venous Thromboembolism. *Circ Res*. 2021 Jun 11;128(12):2017–36.
85. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep;7(9):678–89.
86. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159–75.
87. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Oct;7(10):803–15.
88. Smith NL, Rice KM, Bovill EG, Cushman M, Bis JC, McKnight B, et al. Genetic variation associated with plasma von Willebrand factor levels and the risk of incident venous thrombosis. *Blood*. 2011 Jun 2;117(22):6007–11.
89. Najem MY, Couturaud F, Lemarié CA. Cytokine and chemokine regulation of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2020 May;18(5):1009–19.
90. Van der Ent MA, Svilar D, Cleuren ACA. Molecular analysis of vascular gene expression. *Res Pract Thromb Haemost*. 2022 May;6(4):e12718.
91. Lin Z, Kumar A, SenBanerjee S, Staniszewski K, Parmar K, Vaughan DE, et al. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function. *Circ Res*. 2005 Mar 18;96(5):e48-57.
92. Hobohm L, Kölmel S, Niemann C, Kümpers P, Krieg VJ, Bochenek ML, et al. Role of angiotensin-2 in venous thrombus resolution and chronic thromboembolic disease. *Eur Respir J*. 2021 Dec;58(6):2004196.
93. Stark K, Massberg S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nat Rev Cardiol*. 2021 Sep;18(9):666–82.
94. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011 Nov 7;17(11):1423–36.
95. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 2008 Feb 21;451(7181):914–8.

96. Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest.* 2012 Jul;122(7):2331–6.
97. Dhanesha N, Nayak MK, Doddapattar P, Jain M, Flora GD, Kon S, et al. Targeting myeloid-cell specific integrin  $\alpha 9\beta 1$  inhibits arterial thrombosis in mice. *Blood.* 2020 Mar 12;135(11):857–61.
98. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018 Feb;18(2):134–47.
99. Ortega-Gomez A, Salvermoser M, Rossaint J, Pick R, Brauner J, Lemnitzer P, et al. Cathepsin G Controls Arterial But Not Venular Myeloid Cell Recruitment. *Circulation.* 2016 Oct 18;134(16):1176–88.
100. Pircher J, Czermak T, Ehrlich A, Eberle C, Gaitzsch E, Margraf A, et al. Cathelicidins prime platelets to mediate arterial thrombosis and tissue inflammation. *Nat Commun.* 2018 Apr 18;9(1):1523.
101. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metrio M, Panciroli C, et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost.* 2014 Dec;12(12):2074–88.
102. Stark K, Philippi V, Stockhausen S, Busse J, Antonelli A, Miller M, et al. Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. *Blood.* 2016 Nov 17;128(20):2435–49.
103. Vogel S, Bodenstein R, Chen Q, Feil S, Feil R, Rheinlaender J, et al. Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *J Clin Invest.* 2015 Dec;125(12):4638–54.
104. Mackman N. Eosinophils, atherosclerosis, and thrombosis. *Blood.* 2019 Nov 21;134(21):1781–2.
105. Gushiken FC, Han H, Li J, Rumbaut RE, Afshar-Kharghan V. Abnormal platelet function in C3-deficient mice. *J Thromb Haemost.* 2009 May;7(5):865–70.
106. Sauter RJ, Sauter M, Reis ES, Emschermann FN, Nording H, Ebenhöch S, et al. Functional Relevance of the Anaphylatoxin Receptor C3aR for Platelet Function and Arterial Thrombus Formation Marks an Intersection Point Between Innate Immunity and Thrombosis. *Circulation.* 2018 Oct 16;138(16):1720–35.
107. Chernysh IN, Nagaswami C, Kosolapova S, Peshkova AD, Cuker A, Cines DB, et al. The distinctive structure and composition of arterial and venous thrombi and pulmonary emboli. *Sci Rep.* 2020 Mar 20;10(1):5112.
108. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev.* 2011 Jan;91(1):327–87.
109. Wong DJ, Park DD, Park SS, Haller CA, Chen J, Dai E, et al. A PSGL-1 glycomimetic reduces thrombus burden without affecting hemostasis. *Blood.* 2021 Sep 30;138(13):1182–93.

110. Gupta N, Sahu A, Prabhakar A, Chatterjee T, Tyagi T, Kumari B, et al. Activation of NLRP3 inflammasome complex potentiates venous thrombosis in response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 May 2;114(18):4763–8.
111. Ponomaryov T, Payne H, Fabritz L, Wagner DD, Brill A. Mast Cells Granular Contents Are Crucial for Deep Vein Thrombosis in Mice. *Circ Res*. 2017 Sep 29;121(8):941–50.
112. Yago T, Liu Z, Ahamed J, McEver RP. Cooperative PSGL-1 and CXCR2 signaling in neutrophils promotes deep vein thrombosis in mice. *Blood*. 2018 Sep 27;132(13):1426–37.
113. Bertin FR, Rys RN, Mathieu C, Laurance S, Lemarié CA, Blostein MD. Natural killer cells induce neutrophil extracellular trap formation in venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2019;17(2):403–14.
114. Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev*. 2016 Sep;273(1):11–28.
115. Paul F, Arkin Y, Giladi A, Jaitin DA, Kenigsberg E, Keren-Shaul H, et al. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell*. 2016 Jan 14;164(1–2):325.
116. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2018 Jun;82(1):e00057-17.
117. Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):302–14.
118. Martin C, Burdon PCE, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003 Oct;19(4):583–93.
119. Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*. 2008 Nov;125(3):281–8.
120. Németh T, Sperandio M, Mócsai A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2020 Apr;19(4):253–75.
121. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
122. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012 Sep;18(9):1386–93.
123. Jorch SK, Kuberski P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017 Mar 7;23(3):279–87.
124. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep*. 2014 Aug 7;8(3):883–96.

125. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013 Oct 17;122(16):2784–94.
126. Chen KW, Demarco B, Broz P. Beyond inflammasomes: emerging function of gasdermins during apoptosis and NETosis. *EMBO J*. 2020 Jan 15;39(2):e103397.
127. Lin A, Loré K. Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family. *Front Immunol*. 2017;8:1781.
128. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jul 25;11(8):519–31.
129. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 7;107(36):15880–5.
130. Campos J, Ponomaryov T, De Prendergast A, Whitworth K, Smith CW, Khan AO, et al. Neutrophil extracellular traps and inflammasomes cooperatively promote venous thrombosis in mice. *Blood Advances*. 2021 May 11;5(9):2319–24.
131. Münzer P, Negro R, Fukui S, di Meglio L, Aymonnier K, Chu L, et al. NLRP3 Inflammasome Assembly in Neutrophils Is Supported by PAD4 and Promotes NETosis Under Sterile Conditions. *Front Immunol*. 2021;12:683803.
132. Martinod K, Demers M, Fuchs TA, Wong SL, Brill A, Gallant M, et al. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 May 21;110(21):8674–9.
133. Martinod K, Witsch T, Farley K, Gallant M, Remold-O'Donnell E, Wagner DD. Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2016 Mar;14(3):551–8.
134. Sorvillo N, Mizurini DM, Coxon C, Martinod K, Tilwawala R, Cherpokova D, et al. Plasma Peptidylarginine Deiminase IV Promotes VWF-Platelet String Formation and Accelerates Thrombosis After Vessel Injury. *Circ Res*. 2019 Aug 16;125(5):507–19.
135. Zirka G, Robert P, Tilburg J, Tishkova V, Maracle CX, Legendre P, et al. Impaired adhesion of neutrophils expressing Slc44a2/HNA-3b to VWF protects against NETosis under venous shear rates. *Blood*. 2021 Apr 22;137(16):2256–66.
136. Cherpokova D, Jouvène CC, Libreros S, DeRoo EP, Chu L, de la Rosa X, et al. Resolvin D4 attenuates the severity of pathological thrombosis in mice. *Blood*. 2019 Oct 24;134(17):1458–68.
137. van Montfoort ML, Stephan F, Lauw MN, Hutten BA, Van Mierlo GJ, Solati S, et al. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Jan;33(1):147–51.
138. Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, Henke PK, et al. Plasma DNA is Elevated in Patients with Deep Vein Thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*. 2013 Oct 1;1(4).

139. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014 May 1;123(18):2768–76.
140. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jun;14(6):392–404.
141. Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, et al. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):111–20.
142. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, Krijgsveld J, et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol*. 2013 Aug;14(8):821–30.
143. Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, Chawla A. Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science*. 2013 Sep 27;341(6153):1483–8.
144. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TPJ. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol*. 2013;4:23.
145. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007 Aug 3;317(5838):666–70.
146. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*. 2013 Apr 11;153(2):362–75.
147. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):21–35.
148. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):445–55.
149. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*. 2015 Dec;15(12):731–44.
150. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010 Oct;11(10):889–96.
151. Granger V, Faille D, Marani V, Noël B, Gallais Y, Szely N, et al. Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *J Leuk Biol*. 2017 Sep;102(3):775–81.
152. Laurance S, Bertin FR, Ebrahimian T, Kassim Y, Rys RN, Lehoux S, et al. Gas6 Promotes Inflammatory (CCR2hiCX3CR1lo) Monocyte Recruitment in Venous Thrombosis. *ATVB*. 2017 Jul;37(7):1315–22.

153. Kimball AS, Obi AT, Luke CE, Dowling AR, Cai Q, Adili R, et al. Ly6C<sup>Lo</sup> Monocyte/Macrophages are Essential for Thrombus Resolution in a Murine Model of Venous Thrombosis. *Thromb Haemost*. 2020 Feb;120(2):289–99.
154. Shahneh F, Christian Probst H, Wiesmann SC, A-Gonzalez N, Ruf W, Steinbrink K, et al. Inflammatory Monocyte Counts Determine Venous Blood Clot Formation and Resolution. *ATVB*. 2022 Feb;42(2):145–55.
155. Zhang Y, Cui J, Zhang G, Wu C, Abdel-Latif A, Smyth SS, et al. Inflammasome activation promotes venous thrombosis through pyroptosis. *Blood Adv*. 2021 Jun 22;5(12):2619–23.
156. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Taruya A, Furuta M, et al. Contribution of the TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )-TNF-Rp55 (Tumor Necrosis Factor Receptor p55) Axis in the Resolution of Venous Thrombus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Nov;38(11):2638–50.
157. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Taruya A, Ozaki M, et al. Crucial Involvement of IL-6 in Thrombus Resolution in Mice via Macrophage Recruitment and the Induction of Proteolytic Enzymes. *Front Immunol*. 2020 Feb 7;10:3150.
158. Mukhopadhyay S, Antalis TM, Nguyen KP, Hoofnagle MH, Sarkar R. Myeloid p53 regulates macrophage polarization and venous thrombus resolution by inflammatory vascular remodeling in mice. *Blood*. 2017 Jun 15;129(24):3245–55.
159. Gurish MF, Austen KF. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity*. 2012 Jul 27;37(1):25–33.
160. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2004 Oct;4(10):787–99.
161. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jul;14(7):478–94.
162. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005 Feb;6(2):135–42.
163. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol*. 2015;6:620.
164. Stelekati E, Bahri R, D’Orlando O, Orinska Z, Mittrücker HW, Langenhaun R, et al. Mast cell-mediated antigen presentation regulates CD8<sup>+</sup> T cell effector functions. *Immunity*. 2009 Oct 16;31(4):665–76.
165. Nakae S, Suto H, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 3;102(18):6467–72.
166. Voehringer D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat Rev Immunol*. 2013 May;13(5):362–75.



167. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CMM, Tsai M. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:749–86.
168. Spits H, Bernink JH, Lanier L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat Immunol.* 2016 Jun 21;17(7):758–64.
169. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008 May;9(5):503–10.
170. Di Santo JP. NATURAL KILLER CELL DEVELOPMENTAL PATHWAYS: A Question of Balance. *Annu Rev Immunol.* 2006 Apr 1;24(1):257–86.
171. Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15R $\alpha$  and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis. *J Exp Med.* 2004 Oct 4;200(7):825–34.
172. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity.* 1998 Nov;9(5):669–76.
173. Rubinstein MP, Kovar M, Purton JF, Cho JH, Boyman O, Surh CD, et al. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 13;103(24):9166–71.
174. Walzer T, Chiossone L, Chaix J, Calver A, Carozzo C, Garrigue-Antar L, et al. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1337–44.
175. Mayol K, Biajoux V, Marvel J, Balabanian K, Walzer T. Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood.* 2011 Nov 3;118(18):4863–71.
176. Kim S, Iizuka K, Kang HSP, Dokun A, French AR, Greco S, et al. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol.* 2002 Jun;3(6):523–8.
177. Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol.* 2006 Feb 1;176(3):1517–24.
178. Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood.* 2009 May 28;113(22):5488–96.
179. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 2001 May 15;97(10):3146–51.
180. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N, et al. Absence of IFN- $\gamma$  accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression in mice. *J Clin Invest.* 2011 Jul;121(7):2911–20.

181. Luther N, Shahneh F, Brähler M, Krebs F, Jäckel S, Subramaniam S, et al. Innate Effector-Memory T-Cell Activation Regulates Post-Thrombotic Vein Wall Inflammation and Thrombus Resolution. *Circ Res*. 2016 Dec 9;119(12):1286–95.
182. Nour-Eldine W, Joffre J, Zibara K, Esposito B, Giraud A, Zeboudj L, et al. Genetic Depletion or Hyperresponsiveness of Natural Killer Cells Do Not Affect Atherosclerosis Development. *Circ Res*. 2018 Jan 5;122(1):47–57.
183. Winkels H, Ley K. Natural Killer Cells at Ease: Atherosclerosis Is Not Affected by Genetic Depletion or Hyperactivation of Natural Killer Cells. *Circ Res*. 2018 Jan 5;122(1):6–7.
184. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct;9(10):729–40.
185. Trouw LA, Pickering MC, Blom AM. The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2017 Sep;13(9):538–47.
186. Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Jan;9(1):43–56.
187. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2008 Oct;8(10):776–87.
188. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):682–7.
189. Muhlfelder TW, Niemetz J, Kreutzer D, Beebe D, Ward PA, Rosenfeld SI. C5 chemotactic fragment induces leukocyte production of tissue factor activity: a link between complement and coagulation. *J Clin Invest*. 1979 Jan 1;63(1):147–50.
190. Wojta J, Kaun C, Zorn G, Ghannadan M, Hauswirth AW, Sperr WR, et al. C5a stimulates production of plasminogen activator inhibitor-1 in human mast cells and basophils. *Blood*. 2002 Jul 15;100(2):517–23.
191. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S–C4b binding protein complex. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1192–201.
192. Subramaniam S, Jurk K, Hobohm L, Jäckel S, Saffarzadeh M, Schwierczek K, et al. Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in venous thrombus development. *Blood*. 2017 Apr 20;129(16):2291–302.
193. Afshar-Kharghan V. Complement and clot. *Blood*. 2017 Apr 20;129(16):2214–5.
194. Buil A, Trégouët DA, Souto JC, Saut N, Germain M, Rotival M, et al. C4BPB/C4BPA is a new susceptibility locus for venous thrombosis with unknown protein S-independent mechanism: results from genome-wide association and gene expression analyses followed by case-control studies. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4644–50.

195. Skjeflo EW, Brækkan SK, Ludviksen JK, Snir O, Hindberg K, Mollnes TE, et al. Elevated plasma concentration of complement factor C5 is associated with risk of future venous thromboembolism. *Blood*. 2021 Nov 25;138(21):2129–37.
196. Grover SP, Hindberg K, Wolberg AS, Braekkan S, Mackman N, Hansen J bjarne. Abstract 110: C1 Esterase Inhibitor Functions As An Anticoagulant In Human And Murine Venous Thrombosis. *ATVB* [Internet]. 2021 Sep [cited 2022 Jun 20];41(Suppl\_1). Available from: [https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/atvb.41.suppl\\_1.110](https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/atvb.41.suppl_1.110)
197. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. 2002 May;2(5):309–22.
198. Taniuchi I. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36:579–601.
199. Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:137–61.
200. Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM. The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat Rev Immunol*. 2016 Feb;16(2):102–11.
201. Lefrançois L, Marzo AL. The descent of memory T-cell subsets. *Nat Rev Immunol*. 2006 Aug;6(8):618–23.
202. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(7):387–401.
203. Roy P, Orecchioni M, Ley K. How the immune system shapes atherosclerosis: roles of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2022 Apr;22(4):251–65.
204. Mallat Z, Binder CJ. The why and how of adaptive immune responses in ischemic cardiovascular disease. *Nat Cardiovasc Res*. 2022 May;1(5):431–44.
205. Mukhopadhyay S, Gabre J, Chabasse C, Bromberg JS, Antalis TM, Sarkar R. Depletion of CD4 and CD8 Positive T Cells Impairs Venous Thrombus Resolution in Mice. *IJMS*. 2020 Feb 28;21(5):1650.
206. Shahneh F, Alexandra G, Klein M, Frauhammer F, Bopp T, Schäfer K, et al. Specialized regulatory T cells control venous blood clot resolution through SPARC. *Blood*. 2020 Sep 15;
207. Hardy RR, Kincade PW, Dorshkind K. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity*. 2007 Jun;26(6):703–14.
208. Clark MR, Mandal M, Ochiai K, Singh H. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2014 Feb;14(2):69–80.
209. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol*. 2011 Apr;11(4):251–63.

210. Sage AP, Tsiantoulas D, Binder CJ, Mallat Z. The role of B cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2019 Mar;16(3):180–96.
211. Tsiantoulas D, Sage AP, Mallat Z, Binder CJ. Targeting B Cells in Atherosclerosis: Closing the Gap From Bench to Bedside. *ATVB*. 2015 Feb;35(2):296–302.
212. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jan;11(1):34–46.
213. Vinuesa CG, Chang PP. Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses. *Nat Immunol*. 2013 Feb;14(2):119–26.
214. Zhang Y, Meyer-Hermann M, George LA, Figge MT, Khan M, Goodall M, et al. Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. *J Exp Med*. 2013 Mar 11;210(3):457–64.
215. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science*. 2005 Dec 2;310(5753):1510–2.
216. Tsiantoulas D, Diehl CJ, Witztum JL, Binder CJ. B cells and humoral immunity in atherosclerosis. *Circ Res*. 2014 May 23;114(11):1743–56.
217. Hilgendorf I, Theurl I, Gerhardt LMS, Robbins CS, Weber GF, Gonen A, et al. Innate response activator B cells aggravate atherosclerosis by stimulating T helper-1 adaptive immunity. *Circulation*. 2014 Apr 22;129(16):1677–87.
218. Zougari Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guérin C, et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1273–80.
219. Frey MK, Winter MP, Alimohammadi A, Panzenboeck A, Bonderman D, Lang IM. Resolution Of Venous Thrombus Is Depending On B-Lymphocytes. In: D69 PULMONARY EMBOLISM AND CHRONIC THROMBOEMBOLIC PULMONARY HYPERTENSION [Internet]. American Thoracic Society; 2012 [cited 2022 Jul 9]. p. A6222–A6222. Available from: [http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1\\_MeetingAbstracts.A6222](http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1_MeetingAbstracts.A6222)
220. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, et al. Pannexin 1 channels mediate “find-me” signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*. 2010 Oct 14;467(7317):863–7.
221. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*. 2011 Mar;11(3):201–12.
222. Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019 Aug;19(8):477–89.
223. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2016 Mar;16(3):177–92.

224. Idzko M, Ferrari D, Riegel AK, Eltzschig HK. Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. *Blood*. 2014 Aug 14;124(7):1029–37.
225. Yadav V, Chi L, Zhao R, Tourdot BE, Yalavarthi S, Jacobs BN, et al. ENTPD-1 disrupts inflammasome IL-1 $\beta$ -driven venous thrombosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2019 May 28;129(7):2872–7.
226. Anyanwu AC, Kanthi Y, Fukase K, Liao H, Mimura T, Desch KC, et al. Tuning the Thromboinflammatory Response to Venous Flow Interruption by the Ectonucleotidase CD39. *ATVB* [Internet]. 2019 Apr [cited 2022 Aug 8];39(4). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.119.312407>
227. Chen R, Kang R, Tang D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp Mol Med*. 2022 Feb;54(2):91–102.
228. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu Rev Immunol*. 2011 Apr 23;29(1):139–62.
229. Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Jan 31;8(4):195–202.
230. Schober A, Nazari-Jahantigh M, Weber C. MicroRNA-mediated mechanisms of the cellular stress response in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2015 Jun;12(6):361–74.
231. Loyer X, Mallat Z, Boulanger CM, Tedgui A. MicroRNAs as therapeutic targets in atherosclerosis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2015 Apr 3;19(4):489–96.
232. Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating MicroRNAs: Biomarkers or Mediators of Cardiovascular Diseases? Sessa WC, editor. *ATVB*. 2011 Nov;31(11):2383–90.
233. Simsekyilmaz S, Cabrera-Fuentes HA, Meiler S, Kostin S, Baumer Y, Liehn EA, et al. Role of extracellular RNA in atherosclerotic plaque formation in mice. *Circulation*. 2014 Feb 4;129(5):598–606.
234. Cabrera-Fuentes H, Ruiz-Meana M, Simsekyilmaz S, Kostin S, Inserte J, Saffarzadeh M, et al. RNase1 prevents the damaging interplay between extracellular RNA and tumour necrosis factor- $\alpha$  in cardiac ischaemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost*. 2014;112(12):1110–9.
235. Chen C, Feng Y, Zou L, Wang L, Chen HH, Cai JY, et al. Role of extracellular RNA and TLR3-Trif signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Am Heart Assoc*. 2014 Jan 3;3(1):e000683.
236. Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, et al. Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2457–65.
237. Nakazawa F, Kannemeier C, Shibamiya A, Song Y, Tzima E, Schubert U, et al. Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *Biochemical Journal*. 2005 Feb 1;385(3):831–8.

238. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 10;104(15):6388–93.
239. Vu TT, Zhou J, Leslie BA, Stafford AR, Fredenburgh JC, Ni R, et al. Arterial thrombosis is accelerated in mice deficient in histidine-rich glycoprotein. *Blood*. 2015 Apr 23;125(17):2712–9.
240. Zerneck A, Preissner KT. Extracellular Ribonucleic Acids (RNA) Enter the Stage in Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2016 Feb 5;118(3):469–79.
241. Sharifpanah F, De Silva S, Bekhite MM, Hurtado-Oliveros J, Preissner KT, Wartenberg M, et al. Stimulation of vasculogenesis and leukopoiesis of embryonic stem cells by extracellular transfer RNA and ribosomal RNA. *Free Radic Biol Med*. 2015 Dec;89:1203–17.
242. O’Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jun;13(6):453–60.
243. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):499–511.
244. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):373–84.
245. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2020 Feb;20(2):95–112.
246. Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med*. 2010 Nov;14(11):2592–603.
247. Lin Q, Li M, Fang D, Fang J, Su SB. The essential roles of Toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases. *Int Immunopharmacol*. 2011 Oct;11(10):1422–32.
248. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJD, Kirschning CJ, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2894–903.
249. Shi B, Huang Q, Tak PP, Vervoordeldonk MJ, Huang CC, Dorfleutner A, et al. SNAPIN: an endogenous Toll-like receptor ligand in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Aug;71(8):1411–7.
250. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*. 2009 Jan 1;457(7225):102–6.
251. Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, et al. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med*. 2008 Oct 27;205(11):2609–21.

252. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001 Oct 18;413(6857):732–8.
253. Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem*. 2004 Mar 26;279(13):12542–50.
254. Karikó K, Bhuyan P, Capodici J, Weissman D. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol*. 2004 Jun 1;172(11):6545–9.
255. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2007 Oct;117(10):2847–59.
256. Bell MT, Puskas F, Agoston VA, Cleveland JC, Freeman KA, Gamboni F, et al. Toll-like receptor 4-dependent microglial activation mediates spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2013 Sep 10;128(11 Suppl 1):S152-156.
257. Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebault A, Chan E, et al. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med*. 2009 Jul;15(7):774–80.
258. Riddell JR, Bshara W, Moser MT, Spornyak JA, Foster BA, Gollnick SO. Peroxiredoxin 1 controls prostate cancer growth through Toll-like receptor 4-dependent regulation of tumor vasculature. *Cancer Res*. 2011 Mar 1;71(5):1637–46.
259. Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, Shlomchik MJ. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity*. 2006 Sep;25(3):417–28.
260. Wu X, Peng SL. Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus. *Arthritis Rheum*. 2006 Jan;54(1):336–42.
261. Kawasaki T, Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Sep 25 [cited 2022 Aug 6];5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00461/abstract>
262. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol*. 2014 Aug;14(8):546–58.
263. Henke PK, Mitsuya M, Luke CE, Elflin MA, Baldwin JF, Deatrick KB, et al. Toll-like receptor 9 signaling is critical for early experimental deep vein thrombosis resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Jan;31(1):43–9.
264. Sarkar SN, Smith HL, Rowe TM, Sen GC. Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 2003 Feb 14;278(7):4393–6.

265. Sarkar SN, Peters KL, Elco CP, Sakamoto S, Pal S, Sen GC. Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Nov;11(11):1060–7.
266. Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Crystal Structure of Human Toll-Like Receptor 3 (TLR3) Ectodomain. *Science.* 2005 Jul 22;309(5734):581–5.
267. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 9;101(10):3516–21.
268. Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science.* 2007 Sep 14;317(5844):1522–7.
269. Shibamiya A, Hersemeyer K, Schmidt Wöll T, Sedding D, Daniel JM, Bauer S, et al. A key role for Toll-like receptor-3 in disrupting the hemostasis balance on endothelial cells. *Blood.* 2009 Jan 15;113(3):714–22.
270. Zimmer S, Steinmetz M, Asdonk T, Motz I, Coch C, Hartmann E, et al. Activation of Endothelial Toll-Like Receptor 3 Impairs Endothelial Function. *Circ Res.* 2011 May 27;108(11):1358–66.
271. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003 Oct 1;102(7):2660–9.
272. Khan F, Rahman A, Carrier M, Kearon C, Weitz JI, Schulman S, et al. Long term risk of symptomatic recurrent venous thromboembolism after discontinuation of anticoagulant treatment for first unprovoked venous thromboembolism event: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2019 Jul 24;366:l4363.
273. Sage AP, Nus M, Baker LL, Finigan AJ, Masters LM, Mallat Z. Regulatory B cell-specific interleukin-10 is dispensable for atherosclerosis development in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Aug;35(8):1770–3.
274. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015 Mar;15(3):149–59.
275. Chen Y, Yu M, Podd A, Wen R, Chrzanowska-Wodnicka M, White GC, et al. A critical role of Rap1b in B-cell trafficking and marginal zone B-cell development. *Blood.* 2008 May 1;111(9):4627–36.
276. Palm AKE, Henry C. Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination. *Front Immunol.* 2019 Jul 31;10:1787.
277. Tomayko MM, Steinel NC, Anderson SM, Shlomchik MJ. Cutting Edge: Hierarchy of Maturity of Murine Memory B Cell Subsets. *Ji.* 2010 Dec 15;185(12):7146–50.
278. Zuccarino-Catania GV, Sadanand S, Weisel FJ, Tomayko MM, Meng H, Kleinstein SH, et al. CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nat Immunol.* 2014 Jul;15(7):631–7.



279. Zhou Z, Wu Q, Yan Z, Zheng H, Chen CJ, Liu Y, et al. Extracellular RNA in a single droplet of human serum reflects physiologic and disease states. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019 Sep 17;116(38):19200–8.
280. Preissner KT, Fischer S, Deindl E. Extracellular RNA as a Versatile DAMP and Alarm Signal That Influences Leukocyte Recruitment in Inflammation and Infection. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Dec 18;8:619221.
281. Gruner HN, McManus MT. Examining the evidence for extracellular RNA function in mammals. *Nat Rev Genet*. 2021 Jul;22(7):448–58.
282. Bhagat S, Biswas I, Ahmed R, Khan GA. Hypoxia induced up-regulation of tissue factor is mediated through extracellular RNA activated Toll-like receptor 3-activated protein 1 signalling. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2020 Sep;84:102459.
283. Tavora B, Mederer T, Wessel KJ, Ruffing S, Sadjadi M, Missmahl M, et al. Tumoural activation of TLR3-SLIT2 axis in endothelium drives metastasis. *Nature*. 2020 Oct;586(7828):299–304.
284. Farkas D, Thompson AAR, Bhagwani AR, Hultman S, Ji H, Kotha N, et al. Toll-like Receptor 3 Is a Therapeutic Target for Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 15;199(2):199–210.
285. O’Dwyer DN, Armstrong ME, Kooblall M, Donnelly SC. Targeting defective Toll-like receptor-3 function and idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2015 Apr;19(4):507–14.
286. Cole JE, Navin TJ, Cross AJ, Goddard ME, Alexopoulou L, Mitra AT, et al. Unexpected protective role for Toll-like receptor 3 in the arterial wall. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 8;108(6):2372–7.
287. Lövgren T, Eloranta ML, Båve U, Alm GV, Rönnblom L. Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum*. 2004 Jun;50(6):1861–72.
288. Sandgren S, Wittrup A, Cheng F, Jönsson M, Eklund E, Busch S, et al. The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. *J Biol Chem*. 2004 Apr 23;279(17):17951–6.
289. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med*. 2009 Aug 31;206(9):1983–94.
290. Lee HK, Dunzendorfer S, Soldau K, Tobias PS. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):153–63.
291. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:857–902.

292. Itoh K, Watanabe A, Funami K, Seya T, Matsumoto M. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN-beta production. *J Immunol.* 2008 Oct 15;181(8):5522–9.
293. Järver P, Dondalska A, Poux C, Sandberg A, Bergenstråhle J, Sköld AE, et al. Single-Stranded Nucleic Acids Regulate TLR3/4/7 Activation through Interference with Clathrin-Mediated Endocytosis. *Sci Rep.* 2018 Oct 26;8(1):15841.
294. Panda S, Nilsson JA, Gekara NO. Deubiquitinase MYSM1 Regulates Innate Immunity through Inactivation of TRAF3 and TRAF6 Complexes. *Immunity.* 2015 Oct 20;43(4):647–59.
295. Lee SMY, Yip TF, Yan S, Jin DY, Wei HL, Guo RT, et al. Recognition of Double-Stranded RNA and Regulation of Interferon Pathway by Toll-Like Receptor 10. *Front Immunol.* 2018;9:516.
296. Huang Y, Zhang Q, Lubas M, Yuan Y, Yalcin F, Efe IE, et al. Synergistic Toll-like Receptor 3/9 Signaling Affects Properties and Impairs Glioma-Promoting Activity of Microglia. *J Neurosci.* 2020 Aug 12;40(33):6428–43.
297. Payne S, De Val S, Neal A. Endothelial-Specific Cre Mouse Models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 Nov;38(11):2550–61.
298. Kilani B, Gourdou-Latyszenok V, Guy A, Bats ML, Peghaire C, Parrens M, et al. Comparison of endothelial promoter efficiency and specificity in mice reveals a subset of Pdgfb-positive hematopoietic cells. *J Thromb Haemost.* 2019 May;17(5):827–40.
299. Kulka M, Metcalfe DD. TLR3 activation inhibits human mast cell attachment to fibronectin and vitronectin. *Mol Immunol.* 2006 Apr;43(10):1579–86.
300. Orinska Z, Bulanova E, Budagian V, Metz M, Maurer M, Bulfone-Paus S. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood.* 2005 Aug 1;106(3):978–87.
301. Boada-Romero E, Martinez J, Heckmann BL, Green DR. The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jul;21(7):398–414.
302. Suresh MV, Dolgachev VA, Zhang B, Balijepalli S, Swamy S, Mooliyil J, et al. TLR3 absence confers increased survival with improved macrophage activity against pneumonia. *JCI Insight.* 2019 Dec 5;4(23).
303. Deng T, Feng X, Liu P, Yan K, Chen Y, Han D. Toll-like receptor 3 activation differentially regulates phagocytosis of bacteria and apoptotic neutrophils by mouse peritoneal macrophages. *Immunol Cell Biol.* 2013 Jan;91(1):52–9.
304. Stadtmann A, Zarbock A. CXCR2: From Bench to Bedside. *Front Immunol.* 2012;3:263.

305. Lupu C, Poulsen E, Roquefeuil S, Westmuckett AD, Kakkar VV, Lupu F. Cellular effects of heparin on the production and release of tissue factor pathway inhibitor in human endothelial cells in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Sep;19(9):2251–62.
306. Lupu C, Lupu F, Dennehy U, Kakkar VV, Scully MF. Thrombin induces the redistribution and acute release of tissue factor pathway inhibitor from specific granules within human endothelial cells in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Nov;15(11):2055–62.
307. Royer PJ, Henrio K, Pain M, Loy J, Roux A, Tissot A, et al. TLR3 promotes MMP-9 production in primary human airway epithelial cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Respir Res.* 2017 Dec 13;18(1):208.
308. Ishibashi M, Sayers S, D'Armiento JM, Tall AR, Welch CL. TLR3 deficiency protects against collagen degradation and medial destruction in murine atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 2013 Jul;229(1):52–61.
309. Stöß C, Laschinger M, Wang B, Lu M, Altmayr F, Hartmann D, et al. TLR3 promotes hepatocyte proliferation after partial hepatectomy by stimulating uPA expression and the release of tissue-bound HGF. *FASEB J.* 2020 Aug;34(8):10387–97.
310. Aizawa T, Imaizumi T, Hirono K, Watanabe S, Tsugawa K, Tanaka H. Chloroquine attenuates TLR3-mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression in cultured human glomerular endothelial cells. *Clin Exp Nephrol.* 2019 Apr;23(4):448–54.
311. Wörnle M, Sauter M, Kastenmüller K, Ribeiro A, Mussack T, Ladurner R, et al. Role of viral receptors TLR3, RIG-I and MDA5 in mesothelial tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis. *Thromb Haemost.* 2009 Jun;101(6):1128–37.
312. Yamashita M, Chattopadhyay S, Fensterl V, Zhang Y, Sen GC. A TRIF-Independent Branch of TLR3 Signaling. *J. Biol. Chem.* 2012 Mar 15;287(6):2825–33.
313. Guo Z, Chen L, Zhu Y, Zhang Y, He S, Qin J, et al. Double-stranded RNA-induced TLR3 activation inhibits angiogenesis and triggers apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2012 Feb;27(2):396–402.
314. Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature.* 2008 Apr 3;452(7187):591–7.
315. Holfeld J, Tepeköylü C, Reissig C, Lobenwein D, Scheller B, Kirchmair E, et al. Toll-like receptor 3 signalling mediates angiogenic response upon shock wave treatment of ischaemic muscle. *Cardiovasc Res.* 2016 Feb 1;109(2):331–43.
316. Chen C, Xu ZQ, Zong YP, Ou BC, Shen XH, Feng H, et al. CXCL5 induces tumor angiogenesis via enhancing the expression of FOXD1 mediated by the AKT/NF- $\kappa$ B pathway in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2019 Feb 21;10(3):178.
317. van Aken BE, Reitsma PH, Rosendaal FR. Interleukin 8 and venous thrombosis: evidence for a role of inflammation in thrombosis. *Br J Haematol.* 2002 Jan;116(1):173–7.

318. van Aken BE, den Heijer M, Bos GM, van Deventer SJ, Reitsma PH. Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation. *Thromb Haemost.* 2000 Apr;83(4):536–9.
319. Fischer S, Nishio M, Dadkhahi S, Gansler J, Saffarzadeh M, Shibamiyama A, et al. Expression and localisation of vascular ribonucleases in endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2011 Feb;105(2):345–55.
320. Schmidt MR, Kristiansen SB, Bøtker HE. Remote ischemic preconditioning: no loss in clinical translation. *Circ Res.* 2013 Dec 6;113(12):1278–80.
321. Cabrera-Fuentes HA, Niemann B, Grieshaber P, Wollbrueck M, Gehron J, Preissner KT, et al. RNase1 as a potential mediator of remote ischaemic preconditioning for cardioprotection. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015 Nov;48(5):732–7.

# **ANNEXE**

## REVIEW ARTICLE

# Cytokine and chemokine regulation of venous thromboembolism

Maria Y. Najem<sup>1</sup> | Francis Couturaud<sup>1</sup>  | Catherine A. Lemarié<sup>1,2</sup>  

<sup>1</sup>EA3878 (GETBO), Brest Hospital, Univ Brest, Brest, France

<sup>2</sup>INSERM 1078, Brest, France

## Correspondence

Catherine A. Lemarié, EA3878 – GETBO, Faculté de Médecine, Université de Bretagne Occidentale, 22 rue Camille Desmoulins, 29238 Brest, France.  
Email: catherine.lemarie@inserm.fr

## Funding information

Région Bretagne; Département du Finistère and Brest Métropole.

## Abstract

Morbidity and mortality from venous thromboembolism (VTE), which refers to deep vein thrombosis and pulmonary embolism, have a substantial effect on the global burden of disease. The field of venous thrombosis research has been dramatically changed over the past 10 years with the improvement of animal models that shed some light on the interaction between inflammation and thrombosis. Important recent advances provided evidence of the implication of the innate immune system in venous thrombosis. In this review, we highlighted the cytokines and chemokines that regulate mechanisms of thrombus formation and resolution. Cytokines are pleiotropic, redundant, and multifunctional endogenous mediators orchestrating the inflammatory responses leading to thrombus formation or resolution. The use of experimental models has revealed the pro-thrombotic activity of some cytokines including interferon- $\gamma$ , interleukin (IL)-6, chemokine ligand 2, IL-17A, IL-9, IL-1 $\beta$ , and transforming growth factor- $\beta$ . Other cytokines such as IL-10, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and IL-8 appear to promote thrombus resolution in late phase of venous thromboembolism. The purpose of this review is to bring together the current knowledge regarding the cytokines and chemokines that have been involved in thrombosis formation and resolution. We postulate that an imbalance between pro-thrombotic and anti-thrombotic cytokines/chemokines may be involved in the pathophysiology of VTE. However, in-depth basic and clinical research in venous thrombosis is still required to fully understand the precise mechanism of action of these cytokines.

## KEYWORDS

inflammation, thrombosis, vein, cytokine, chemokine

## 1 | INTRODUCTION

Venous thromboembolism (VTE), a major health issue associated with significant morbidity and mortality, encompasses deep-vein thrombosis and pulmonary embolism.<sup>1</sup> Among the cardiovascular causes of death, VTE is the third most common in the world, after

coronary heart disease and ischemic stroke.<sup>2</sup> VTE is defined as an exaggerated hemostatic response, leading to the formation of an occlusive blood clot obliterating blood flow in the venous system.<sup>3</sup> The Virchow triad was traditionally invoked to describe pathophysiologic mechanisms fostering thrombosis, alleging concerted roles for hypercoagulability, endothelial dysfunction, and hemodynamic changes (stasis and turbulence) in the development of arterial and venous thrombosis.<sup>4</sup> However, a growing body of evidence reveals

Manuscript handled by: Andreas Greinacher

Final decision: Andreas Greinacher, 03 February 2020

© 2020 International Society on Thrombosis and Haemostasis

the functional interdependence of inflammation and thrombosis. This intricate interrelationship between these two processes, where inflammation begets thrombosis, and in turn, thrombosis amplifies inflammation, is mediated by the endothelium, leukocytes, and platelets.<sup>5</sup>

All the inflammatory processes are orchestrated by cytokines and chemokines. They have crucial functions in the development, differentiation, and coordination of immune cells. In the setting of atherosclerosis, a chronic inflammatory disorder, the role of cytokines and chemokines has burgeoned in the past years. Cytokines and chemokines participate in all stages of this disease from the early endothelial dysfunction to the late formation of atherosclerotic plaque and are classified into two groups depending on whether they promote or suppress atherogenesis. Hence, interferon (IFN)- $\gamma$ , interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and chemokine ligand 2 (CCL2) exert pro-atherogenic effects, whereas IL-10 exhibits multiple anti-atherogenic activities including the downregulation of TNF- $\alpha$  production. These new insights into the role of cytokines and chemokines in the pathobiology of atherosclerosis gave rise to targeted anti-inflammatory therapies that are now under investigation.<sup>6</sup>

Similarly, it has been suggested that these inflammatory mediators are important players in VTE. The activation of pro-inflammatory mechanisms during VTE has been emphasized by several *in vitro* and *in vivo* studies. Our understanding of the physiopathology and the molecular mechanisms involved in venous thrombosis has been greatly enhanced in the past 10 years. Mouse models resembling the human physiopathology have been developed allowing the discovery of the crucial role of inflammation in venous thrombosis.<sup>7</sup> Venous thrombosis initiation and progression are characterized by complex interactions between the coagulation system and different cell types including platelets, erythrocytes, endothelial cells, and immune cells. Hence, the interaction of circulating leukocytes with the activated venous endothelium is a major event in venous thrombus formation. Neutrophils are recruited very early during the thrombotic process, release neutrophil extracellular traps (NETs) and support thrombosis. Monocytes are also recruited during the early stages of thrombosis development. They stimulate the extrinsic pathway of coagulation through tissue factor delivery.<sup>8,9</sup> Thrombus resolution characterized by the restoration of blood flow resembles wound healing. Leukocytes appear to have a crucial role also at this stage of venous thrombosis. Neutrophils and monocytes invade the thrombus to modulate collagen and fibrin degradation through the secretion of matrix metalloproteinases (MMP) and plasminogen activators, respectively. Furthermore, neovascularization is part of thrombus remodeling and involves the vascular endothelial growth factor (VEGF) that contributes to vein recanalization.<sup>10</sup>

All these processes might be regulated by cytokines and chemokines either rapidly secreted from endothelial pool and from platelet  $\alpha$ -granules or newly synthesized by activated endothelial and immune cells.<sup>11,12</sup> We will review basic research focusing on the

### Essentials

- The complex interplay between inflammation and venous thrombosis is regulated by cytokines.
- Many cytokines are involved in venous thromboembolism.
- Some cytokines are pro-thrombotic and some promote thrombus resolution.
- Deciphering the precise role of cytokines holds the promises of new therapies.

cytokines and some chemokines involved in VTE and discuss potential role in clinical research.<sup>13</sup>

## 2 | CYTOKINES AND VTE

### 2.1 | Interferon- $\gamma$

Interferons were originally discovered as agents that impede viral replication. They are divided into three groups (type I, type II, and type III), conforming to the receptor specificity and sequence homology. Type I includes IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , and IFN- $\tau$ , which bind to a common heterodimeric receptor. Type II consists of IFN- $\gamma$  that acts on a different receptor (IFNGR). Type III embraces IFN- $\lambda$ , that displays IFN-like activities by interacting with its receptor (IL10R2/IFNLR1).<sup>14</sup>

Interferon- $\gamma$ , produced predominantly by natural killer (NK), natural killer T (NKT) cells and by Th1 CD4 and CD8 cytotoxic T lymphocyte, is an essential cytokine that heightens immune surveillance during infection. The secretion of IFN- $\gamma$  is mediated by other cytokines released by antigen-presenting cells (APCs), most notably IL-12 and IL-18. However, negative regulation of IFN- $\gamma$  production entails IL-4, IL-10, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and glucocorticoids.<sup>15</sup>

The IFN- $\gamma$  receptor is expressed in all nucleated cells as a tetramer composed of two IFNGR1 and two IFNGR2 subunits. Both IFNGR chains lack intrinsic kinase/phosphatase activity and must coordinate with the signaling machinery. Binding of IFN- $\gamma$  to IFNGR leads to phosphorylation of signal transducer (STAT1) and its nuclear translocation where it initiates or represses transcription of IFN- $\gamma$  regulated genes.<sup>16</sup>

Several studies pointed to an important role of IFN- $\gamma$  in the regulation of venous thrombosis. In a first study, Ishida et al determined that IFN- $\gamma$ /STAT1 signaling pathway plays a central role in skin wound healing. Given the similarities between thrombus resolution and wound healing, Nosaka et al hypothesized that IFN- $\gamma$  may be involved in VTE. Venous thrombosis was induced in wild-type (WT) and IFN- $\gamma$ -deficient (*Ifng*<sup>-/-</sup>) mice after complete ligation of the inferior vena cava (IVC). They observed a substantial reduction in intrathrombotic collagen area in *Ifng*<sup>-/-</sup> mice compared

with WT mice, associated with a reduced thrombus size. IFN- $\gamma$  plays a detrimental role by attenuating MMP-9 and VEGF gene expression without affecting leukocyte recruitment or expression of tissue plasminogen activator, urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, and chemokines. Thus, IFN- $\gamma$  abrogates collagen degradation and inhibits neovascularization directly by dampening the expression of VEGF and indirectly by hindering MMP-9 proangiogenic activity. The administration of a blocking IFN- $\gamma$  antibody accelerated thrombus resolution without altering coagulation functions. These observations imply that IFN- $\gamma$  reduces neovascularization and collagen degradation that delay thrombus resolution.<sup>17</sup>

More recent studies investigated the source and regulation of IFN- $\gamma$  production during thrombus formation and resolution. Luther et al showed that T cells infiltrating the vein wall after venous thrombosis produce IFN- $\gamma$ . VTE, induced by partial ligation (stenosis) of the IVC, was associated with an upregulation of a cocktail of cytokines and chemokines that synergize to trigger IFN- $\gamma$  secretion by effector-memory T cells (TEM). TEM depletion blunted IFN- $\gamma$  production and was associated with a drastic reduction in thrombus size and weight underlying a central role of IFN- $\gamma$  in thrombus resolution. This finding was explained by an increase in MMP-9 expression in TEM depleted mice. The IFN- $\gamma$  deficit was also correlated with an enhancement in intrathrombotic recanalization revealed by a higher expression of CD31, a marker of endothelial cells.<sup>18</sup>

In addition, Schönfelder et al recently investigated venous thrombosis in T-box expressed on T cells (Tbet)-deficient (*Tbx21*<sup>-/-</sup>) mice using the IVC stenosis model. *Tbx21*<sup>-/-</sup> mice lack the transcription factor Tbet that governs the transcription of IFN- $\gamma$  and IL-12. Hence, Tbet deficiency led to an attenuated inflammation, an ameliorated revascularization, and an accelerated thrombus resolution. This was depicted by a reduction of pro-inflammatory Ly6C<sup>hi</sup> monocytes in thrombi, an increase of *Vegf* mRNA expression and an infiltration of reparative monocytes. These results confirm an association between IFN- $\gamma$  and thrombus resolution.<sup>19</sup>

In contrast, we studied the role of IFN- $\gamma$  in thrombus formation. Using the stenosis model, we found a reduction in thrombus size and decreased NET formation in *Ifng*<sup>-/-</sup> and *Tbx21*<sup>-/-</sup> mice, suggesting that Tbet/IFN- $\gamma$ -expressing cells are required for venous thrombosis by bolstering NETosis without affecting neutrophils or monocytes recruitment. Injection of an IFN- $\gamma$ -blocking antibody to WT mice or administration of recombinant IFN- $\gamma$  to *Ifng*<sup>-/-</sup> mice showed that IFN- $\gamma$  is directly implicated in thrombus and NET formation. NK cell depletion and adoptive transfer of WT or *Ifng*<sup>-/-</sup> NK cells to *Ifng*<sup>-/-</sup> mice revealed that NK cells promote thrombus formation through secretion of IFN- $\gamma$ . Although the direct mechanism linking IFN- $\gamma$  to NET formation has not yet been identified, we speculated that IFN- $\gamma$  contributes to NETosis by enhancing Ca<sup>2+</sup> flux and reactive oxygen species production.<sup>20</sup>

Collectively, these data demonstrate that IFN- $\gamma$  enhances thrombus formation and delays thrombus resolution.

## 2.2 | Interleukin-6

Interleukin-6 is a prototypical four-helix bundle cytokine with a plethora of physiological functions that cover regulation of immune cell proliferation and differentiation as well as the coordination of the innate and the adaptive immune systems. This cytokine is secreted by many cell types including monocytes and macrophages after the engagement of Toll-like receptors; endothelial cells after IL-1 activation; and subsets of B and T cells after viral infection.<sup>21</sup>

The IL-6 receptor (IL-6R) is composed of an 80-kD receptor lacking intrinsic enzymatic activity and a universally expressed glycoprotein 130 (gp130; also known as CD130). Although gp130 is ubiquitously expressed, IL-6R is restricted to some cells, such as hepatocytes, some leukocytes, and epithelial cells. IL-6R also exists in a soluble form, which is generated via IL-6R ectodomain shedding by the protease disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 (ADAM17). IL-6 signaling converges toward the homodimerization and phosphorylation of gp130, leading to the activation of RAS-mitogen-activated protein kinase-phosphoinositide 3-kinase and STAT1 and STAT3 pathways and transcription of pro-inflammatory genes.<sup>22</sup>

Several studies have shown an association between plasma levels of IL-6, VTE, and postthrombotic syndrome.<sup>23,24</sup> However, the causal relation between IL-6 and venous thrombosis remains under debate, at least in human studies. Wojcik et al demonstrated that IL-6 is a potential target for postthrombotic syndrome, a chronic and frequent complication of VTE. Neutralization of IL-6 reduced the production of CCL2, decreased monocyte recruitment, and attenuated vein wall intimal thickness and fibrosis. Recruited neutrophils proteolytically cleave IL-6R giving rise to the soluble form of IL-6R that complexes with IL-6 released by endothelial cells. This combination binds to gp130 located on endothelial cells inducing production of CCL2 and monocytes recruitment leading to chronic inflammation. These monocytes produce cytokines and growth factors that directly stimulate fibroblasts and smooth muscle cells, triggering collagen deposition.<sup>25</sup>

A recent study by Zhang et al highlighted the molecular pathways of IL-6 regulation during VTE formation both in patients and in the stenosis experimental model. IL-6 circulating levels were increased in VTE patients compared with healthy controls. MicroRNA microarray assay analysis revealed that 59 microRNAs were dysregulated in VTE patients and one of them, miR-338-5p, targeted IL-6. Interestingly, modulation of IL-6 expression by miR-338-5p was associated with decreased CCL2, CCL3, ICAM-1, VCAM-1, and SELP expression in vitro and reduced thrombus weight in vivo.<sup>26</sup>

Collectively, these observations confirmed that IL-6 neutralization might be beneficial to reduce inflammation during thrombus formation and fibrosis that occurs after thrombus resolution. However, in both studies, IL-6 blocking was done before thrombus formation. Thus, it remains difficult to distinguish early to late effects of IL-6 on thrombosis and vascular wall remodeling.



### 2.3 | Interleukin-17

Interleukin-17A, the hallmark cytokine of the T helper 17 (TH17) cell, is a central player in immunity that modulates the release of a broad range of cytokines and chemokines in a variety of cell types, including epithelial cells, endothelial cells, and fibroblasts.<sup>27</sup> Several putative IL-17A homologues (IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, and IL-17F) have been identified.<sup>28</sup> IL-17A and IL-17F are the best characterized and signal through the activation of the mitogen-activated protein kinase and NF $\kappa$ B pathways.<sup>29</sup>

Interleukin-17 is not a potent inducer of inflammation by itself. Its impact in immunity is derived from its synergistic action with other factors and its positive autofeedback loop.<sup>29</sup> For example, the synergistic activation of endothelial cells by TNF- $\alpha$  and IL-17 sustain neutrophil recruitment through expression of selectins, CXCL1, CXCL2, and CXCL5.<sup>30</sup> In contrast, IL-17 and IFN- $\gamma$ , coproduced by TH17 cells or produced individually by TH1 or TH17 cells, have additive effects including recruitment of T cells, macrophages, and neutrophils.<sup>31</sup>

Interleukin-17 has first been involved in VTE after determining a positive correlation between IL-17 plasma levels in rats and thrombus formation. However, the molecular mechanisms have not yet been established.<sup>32</sup> Other studies demonstrated that IL-17A contributes to platelet aggregation and suggested that IL-17A-mediated changes in platelet function could be implicated in venous thrombosis generation by promoting NET formation.<sup>33,34</sup> Ding et al investigated the specific role of IL-17A during VTE formation. Using the St. Thomas stenosis model, they observed an increase in thrombus length and weight in the rIL-17A-treated group compared with the control group. In contrast, treatment with an IL-17A blocking antibody reduced thrombosis. Markers of platelet activation (CD61 and CD49 $\beta$ ) and platelet aggregation were upregulated in the rIL-17A group and downregulated in the anti-IL-17A group. IL-17A also contributed to neutrophil infiltration into thrombi by regulating the expression of plasmatic CXCL2. They demonstrated that IL-17A amplifies NETosis, thus exacerbating VTE pathogenesis. In addition, IL-17A increased VCAM-1 and ICAM-1 expression by endothelial cells.

In summary, these results indicate that IL-17A promotes thrombus formation by enhancing platelet activation and aggregation, neutrophil infiltration, and endothelial cell activation.<sup>35</sup> Conditional and tissue specific knockout models might be useful to definitely establish the role of IL-17 during thrombus formation.

### 2.4 | Interleukin-9

Interleukin-9 is produced by mast cells, NKT cells, by T helper 9 (T<sub>H</sub>9), T<sub>H</sub>17, and regulatory T cells. IL-9 can function as both a positive and negative regulator of immune responses by acting on different cell types. IL-9 supports the expansion of mast cells and enhances the production of several cytokines, including IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, and IL-13. Additionally, IL-9 facilitates T<sub>H</sub>17 cell proliferation and

stimulates regulatory T-cell suppressive functions. IL-9 targets APCs to promote TGF- $\beta$  production and downregulates IL-12 expression. IL-9 binds to a heterodimeric receptor composed of the IL-9 receptor  $\alpha$ -chain (IL-9R $\alpha$ ) and the  $\gamma$  chain to induce STAT1, 3, and 5.<sup>36</sup>

In previous studies, Zhang et al<sup>37</sup> demonstrated that IL-17 promotes the development of arterial and venous thrombosis by favoring platelet activation and aggregation. Given that IL-9 enhances the production of IL-17 from T<sub>H</sub>17 cells in vitro, the authors hypothesized that IL-9 could induce VTE development by facilitating IL-17A production.<sup>38</sup> Feng et al found higher IL-9 and P-selectin plasma levels in patients with VTE compared with the control group. IL-9R expression was detected on mice platelets and leukocytes but not on erythrocytes. IL-9 exerts a positive effect on platelet aggregation in the presence of ADP associated with increased P-selectin expression and activation of JAK2/STAT3 signaling pathway. The relationship between IL-9 and venous thrombosis was investigated in vivo using the stasis model of venous thrombosis. Thrombus weight and length were reduced in the group treated with an IL-9-blocking antibody compared with the IL-9-treated group, suggesting a critical role of IL-9 in VTE.

This study indicates that IL-9 promotes VTE by favoring platelet function through the JAK2/STAT3 pathway.<sup>39</sup> However, further studies are required to determine the precise role of IL-9 (ie, time of production and cellular origin) during thrombus formation and perhaps resolution.

### 2.5 | Interleukin-10

Interleukin-10, a cytokine exerting anti-inflammatory properties, modulates both innate and adaptive immunity, thereby hindering damage to the host and maintaining normal tissue homeostasis.<sup>40</sup> IL-10 was initially identified as a T helper 2-type cytokine, but further evidence suggested that it is produced by a wide variety of cell types, including lymphocytes, monocytes/macrophages, neutrophils, mast cells, and epithelial cells.<sup>41</sup> IL-10 binds to a heterodimeric IL-10 receptor (IL-10R) composed of IL-10R1 and IL-10R2 subunits and signals through JAK/STAT, leading to changes in the expression profile of immunomodulatory genes. IL-10 abolishes many functions of NK cells and T cells, by restraining APCs from generating proinflammatory cytokines and molecules involved in antigen presentation and lymphocyte activation.<sup>42</sup>

Because the imbalance between pro- and anti-inflammatory molecules plays an important role in vein wall inflammation associated with venous thrombosis, Downing et al hypothesized that IL-10 might reduce VTE pathogenesis. Venous thrombosis was induced in rat after ligation of the IVC. IL-10 levels were increased in the vein wall during venous thrombosis compared with sham-operated animals. IL-10 neutralization resulted in heightened vein wall inflammation revealed by an amplified leukocyte infiltration. In contrast, injection of rIL-10 at the time of thrombus induction downregulated the inflammatory response and decreased thrombus weight.<sup>43</sup>

This study suggests, as expected, that the anti-inflammatory role of IL-10 might be beneficial in the context of VTE. However, these data need to be revised to decipher the mechanisms by which IL-10 exerts protective effects and maybe facilitate thrombus resolution.

## 2.6 | Interleukin-1 $\beta$

The IL-1 family emerged as a key regulator of inflammatory processes and comprises a total of 11 members, including IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and an inhibitory mediator, the IL-1 receptor antagonist.<sup>44</sup> Stimulated monocytes and macrophages and, to a lesser degree neutrophils, keratinocytes, epithelial and endothelial cells, lymphocytes, smooth muscle cells, and fibroblasts produce IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .<sup>45</sup> The biologically active form of IL-1 $\beta$  is a 17-kD molecule that results from intracellular processing of pro-IL-1 $\beta$ . Its cleavage is mediated by a caspase-1-dependent mechanism in conjunction with inflammasome assembly, and by caspase-1-independent processes involving neutrophil proteases.<sup>46</sup> Binding of IL-1 $\beta$  to IL-1 receptor type 1 (IL-1R1) on target cells induces the recruitment of myeloid differentiation factor 88, IL-1R-associated kinases, and TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) leading to the transcription of pro-inflammatory genes via NF $\kappa$ B signaling pathway.<sup>47</sup>

Based on a previous study demonstrating a strong link between hypoxia and prothrombotic phenotype,<sup>48</sup> Gupta et al unveiled the role of hypoxia-HIF-1 $\alpha$ -NLRP3-IL-1 $\beta$  axis in promoting thrombogenesis. Thrombosis was induced by IVC ligation in rats kept in normal atmosphere conditions or exposed to hypoxia. mRNA expression of IL-1 $\beta$ , caspase-1, and NLRP3 was significantly increased in the hypoxia thrombotic group. Treatments with an inhibitor of hypoxia response pathway or HIF-1 $\alpha$  siRNA led to a decreased expression of NLRP3 and IL-1 $\beta$  transcripts and thrombus weight. The NLRP3-IL-1 $\beta$  axis induces platelet activation. In addition, NLRP3, IL-1 $\beta$  and caspase-1 mRNA expression was higher in patients living in high to extreme altitude regions and diagnose with venous thrombosis compared with healthy age-matched controls.<sup>49</sup> Yadav et al used the stenosis model to investigate how the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (ENTDP1 or CD39) modulate venous thrombosis. CD39 is an ectoenzyme embedded on the surface of endothelial cells and leukocytes that catabolizes ATP. CD39 haploinsufficiency increased venous thrombosis burden, tissue factor and fibrin deposition, NET formation, inflammasome activation, and IL-1 $\beta$  release. The authors demonstrated that venous thrombosis in CD39<sup>+/-</sup> mice was reduced by IL-1 $\beta$  blockade with a neutralizing IL-1 $\beta$  antibody or with a synthetic inhibitor of the IL-1 receptor.<sup>50</sup>

Collectively, these data demonstrate a compelling role for IL-1 $\beta$  for thrombus formation.<sup>50</sup> Studies of CD39 in VTE suggest that IL-1 $\beta$  inhibition represents an attractive therapeutic target. Considering that the Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study has demonstrated the beneficial effect of anti-inflammatory therapy targeting IL-1 $\beta$  on recurrent cardiovascular

event, future studies should consider similar strategies in the context of VTE.<sup>51</sup>

## 2.7 | Tumor necrosis factor- $\alpha$

Tumor necrosis factor- $\alpha$ , a master regulator of inflammation and a critical player in the cytokine network, was first identified for its ability to induce antitumoral responses. It is produced by a variety of cell types including macrophages, T cells, and keratinocytes.<sup>52</sup> TNF- $\alpha$  exists as a transmembrane protein or as a soluble cytokine generated after cleavage by ADAM17 and binds to two distinct receptors, TNF receptor type 1 (TNFR1) and TNF receptor type 2 (TNFR2). TNFR1 is expressed ubiquitously on most cell types except red blood cells, whereas TNFR2 expression is predominantly restrained to hematopoietic cells.<sup>53</sup> Both TNFR1 and TNFR2 signaling complexes converge toward NF $\kappa$ B activation. TNFR2 engagement promotes cell survival via this pathway, whereas TNFR1 binding engenders either cell survival or cell death depending on downstream signaling events and cellular context.<sup>54</sup>

There are still disparities on the role of TNF- $\alpha$  in chemical-induced arterial thrombosis. Hence, a study indicated that TNF- $\alpha$  decreases platelet activation through the rapid generation of nitric oxide in the vessel wall, whereas another one demonstrated the prothrombotic effects of TNF- $\alpha$  by acting on TNFR2.<sup>55,56</sup> Because venous thrombi differ from arterial ones in pathological aspects, the role of TNF- $\alpha$  in VTE remains unclear. Interestingly, Nosaka et al showed that TNF- $\alpha$  is mainly expressed in macrophages infiltrating venous thrombi by using double immunofluorescence analysis. After IVC stenosis in TNFRp55 deficient (*Tnfrp55*<sup>-/-</sup>) mice, they observed slower thrombus shrinkage, delayed blood flow recovery, elevated thrombotic collagen contents and impaired intrathrombotic neovascularization compared with WT mice. Additionally, administration of recombinant TNF- $\alpha$  reduced thrombus size and accelerated blood flow recovery whereas treatment with anti-TNF- $\alpha$  mAb or a TNF- $\alpha$  inhibitor increased thrombus weight and retarded blood flow recovery in WT mice in late stages of venous thrombosis. Ten days post-ligation, *Mmp2*, *Mmp9*, and *Plau* expression was reduced in *Tnfrp55*<sup>-/-</sup> mice compared with WT. In addition, TNF- $\alpha$  increases *Mmp2* expression in macrophages through NF $\kappa$ B activation and expression of *Mmp9* and *Plau* gene expression mainly through the ERK pathway.<sup>57</sup>

Taken together, these data implied that TNF- $\alpha$  might have a beneficial role during thrombus resolution by improving fibrinolysis, collagenolysis, and neovascularization.

## 2.8 | Transforming growth factor- $\beta$

Transforming growth factor- $\beta$  acts as a growth inhibitor for several cell types including endothelial cells and lymphocytes. TGF- $\beta$  is also a potent pro-fibrotic factor and is responsible for organ sclerosis including liver, skin, lung, kidney, and other tissue. TGF- $\beta$  is released

in association with latency-associated peptide in an inactive form, which binds to latent TGF- $\beta$  binding protein. When exposed to proteases, TGF- $\beta$  becomes active and binds to TGF- $\beta$  receptor II (TGF $\beta$ RII), which then recruits and activates TGF $\beta$ RI (also called ALK1 or ALK5).<sup>58</sup> TGF $\beta$ RI then activates intracellular substrates from the Smad family. Smad proteins translocate to the nucleus where they regulate gene expression, including genes involved in fibrosis.<sup>59</sup>

Because TGF- $\beta$  is a strong pro-fibrotic factor, Bochenek et al recently investigated its role in chronic thromboembolic pulmonary hypertension that is characterized by defective thrombus resolution. Mice with genetic deletion of TGF- $\beta$ 1 in platelets (Plt. TGF $\beta$ -KO) and mice with inducible endothelial-specific deletion of TGF $\beta$ RII (End.TGF $\beta$ RII-KO) were subjected to the stenosis model of venous thrombosis. At day 21, Plt.TGF $\beta$ -KO mice had smaller thrombi compared with Plt.TGF $\beta$ -WT controls without affecting platelet function. In addition, deletion of TGF $\beta$ RII in endothelial cells was associated with increased expression of TGF $\beta$ RI and elevated plasma levels of active TGF $\beta$ 1 because of an upregulation of factors involved in TGF $\beta$  activation such as MMP-9 and thrombospondin-1. Moreover, End.TGF $\beta$ RII-KO mice exhibited larger thrombi resulting from endothelial dysfunction and high amounts of fibrotic material and interstitial collagen compared with End.TGF $\beta$ RII-WT animals. Taken together, these results suggest that TGF- $\beta$ 1 signaling via TGF $\beta$ RI impairs thrombus resolution by favoring fibrosis and endothelial dysfunction.<sup>60</sup>

### 3 | CHEMOKINES AND VTE

Chemokines are potent chemoattractants that regulate the migration patterns and positioning of all immune cells. Initially, chemokines were divided into two groups based on their function. Constitutively expressed chemokines support the homing of stem cells and guide the trafficking of immature lymphocytes from bone marrow to thymus. In contrast, inflammatory chemokines drive leukocyte mobilization to the injured and infected sites to promote wound healing and pathogen elimination, respectively. Because several chemokines present dual function, they are currently classified depending on their structural characteristics.<sup>61,62</sup> The chemokine system presents a bidirectional promiscuity in which some chemokines can stimulate more than one chemokine receptor and many chemokine receptors can be activated by more than one chemokine. The specific effects of chemokines on their target cells are mediated by G protein-coupled receptor superfamily.<sup>63</sup>

#### 3.1 | CXCL8/CXCL1

CXCL8 is a chemokine with polymorphonuclear neutrophil-activating and chemoattractant properties. Given that CXCL8 presents proangiogenic activities, Henke et al suggested that this chemokine might accelerate thrombus resolution. To validate this hypothesis, rats were subjected to IVC ligation to induce VTE. Treatment with

recombinant human CXCL8 increased thrombus blood flow compared with controls. This was associated with an accumulation of neutrophils and an increased neovascularization 4 days post-ligation. In addition, they found reduced VEGF expression, increased fibrosis, and unaltered chemokine levels (CCL2 and CCL3) at 8 days of treatment.<sup>64</sup> These results suggested that CXCL8 treatment enhances thrombus resolution through neovascularization and neutrophil recruitment.

Henke et al further studied the role of Gro-alpha (CXCL1), the closest analogue of CXCL8 in mice, by investigating how its receptor, CXCR2, promote venous thrombosis resolution in a stasis mouse model. CXCR2 deficient (*Cxcr2*<sup>-/-</sup>) and anti-CXCR2 antibody-treated mice have impaired thrombus resolution. This alteration is characterized by larger thrombi, decreased intrathrombus neutrophils and monocytes, reduced neovascularization, and higher fibrin and collagen contents compared with control mice. However, systemic neutropenia did not affect thrombus dissolution.<sup>65</sup>

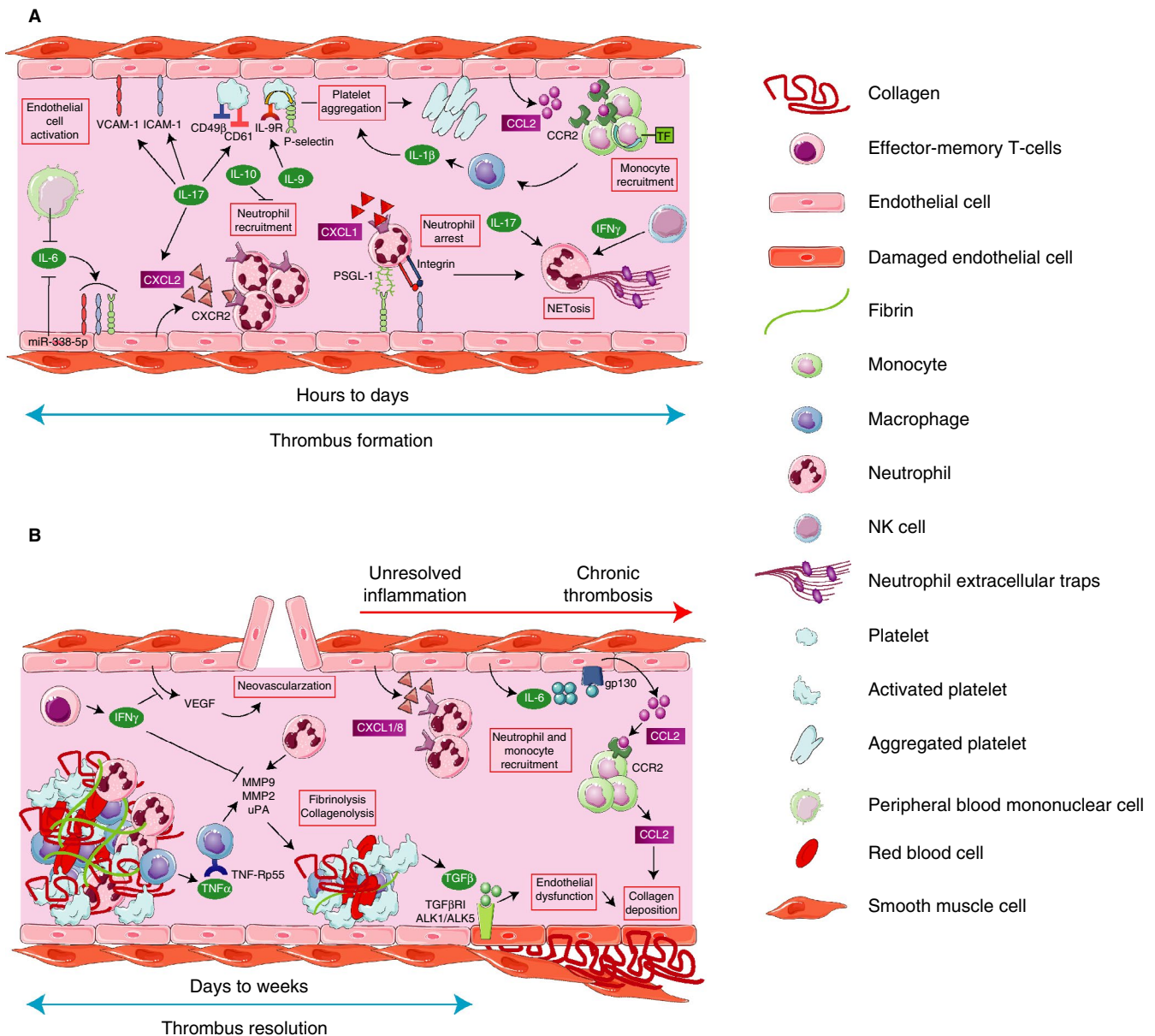
More recently, the precise role of CXCL1 during thrombus formation has been described in a study by Yago et al.<sup>66</sup> They demonstrated that endothelial cells rapidly release CXCL1 after partial ligation of the IVC in mice. *Cxcr2*<sup>-/-</sup> mice developed smaller thrombi than the WT animals. In collaboration with P-selectin, CXCL1 induces slow rolling and arrest of neutrophils through CXCR2. This mechanism enhances NET formation and promotes venous thrombosis.

Taken together, these studies demonstrated that CXCL1/CXCR2 is important for the adhesion of neutrophils to the endothelium and to generate prothrombotic effectors such as NETs in the early phase of thrombus formation. However, in late thrombosis stages, CXCR2 might be required for neovascularization, collagen turnover, and fibrinolysis during VTE resolution.

#### 3.2 | Chemokine ligand 2

Chemokine ligand 2 is a member of the CC chemokine family that governs the recruitment of monocytes, macrophages, and other inflammatory cells via C-C chemokine receptor type 2 (CCR2). A first study by Henke et al suggested a role for CCR2 in thrombus resolution. Thrombosis was induced using the stasis model in WT and CCR2 deficient (*Ccr2*<sup>-/-</sup>) mice. Thrombus size from *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice was significantly greater than the control, 4 to 21 days after induction of thrombosis. This was associated with a reduction in monocyte infiltration and accumulation of CCL2 within the thrombus.<sup>67</sup>

In a later study, we investigated which monocyte subtype was involved in VTE. In this context, we studied the role of growth arrest-specific 6 (Gas6) in the recruitment of monocyte during venous thrombosis. VTE was induced in WT and Gas6-deficient mice using the 5% FeCl<sub>3</sub> and stenosis models. Absence of Gas6 attenuated venous thrombosis and reduced the recruitment of inflammatory monocytes (CCR2<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>lo</sup>) without affecting patrolling monocytes (CX3CR1<sup>hi</sup>) and neutrophils. Furthermore, global monocyte depletion by clodronate and specific inflammatory monocyte deficiency following anti-CCR2 or anti-CCL2 antibody treatment lead to a smaller thrombus



**FIGURE 1** Role of cytokines and chemokines in venous thromboembolism. (A) Thrombus formation results from the interactions between endothelial cells, leukocytes, and platelets regulated by cytokines and chemokines. First, interleukin (IL)-6 and IL-17 induce endothelial cell activation by increasing the expression of adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1, and P-selectin). In addition, endothelial cells secrete CXCL2 and CCL2 promoting neutrophil and monocyte recruitment. IL-10 was found to inhibit neutrophil recruitment. P-selectin/PSGL-1 interaction and CXCR2/CXCL1 engagement cooperate to generate  $\beta$ 2 integrin-dependent arrest in neutrophils and NETosis. Then, interferon (IFN)- $\gamma$ , secreted by natural killer (NK) cells, and IL-17 promote neutrophil extracellular trap (NET) formation and induce venous thrombosis. In parallel, IL-17 and IL-9 regulate platelet activation and aggregation through the expression of CD61 and P-selectin. CCL2-recruited monocytes/macrophages secrete IL-1 $\beta$  also contributing to platelet aggregation. (B) Thrombus resolution, characterized by fibrinolysis, collagenolysis, and neovascularization, is regulated by tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . TNF- $\alpha$  increases MMP-2/MMP-9 and urokinase plasminogen activator (uPA) expression leading to collagenolysis and fibrinolysis, respectively. In contrast, IFN- $\gamma$  produced by effector-memory T cells has detrimental roles in thrombus resolution by suppressing collagenolysis and neovascularization. Ultimately, uncontrolled inflammation leads to venous thromboembolism (VTE) chronicity in part through TGF- $\beta$  and IL-6. TGF- $\beta$  secreted by platelets signals via TGF $\beta$ RI to promote endothelial dysfunction and subsequently collagen deposition. IL-6 released by activated endothelial cells is proposed to exert pro-fibrotic effects after deep vein thrombosis (DVT) through chemokine ligand 2 (CCL2) upregulation. The latter generates monocyte recruitment and CCL2 secretion leading to collagen deposition

compared with control mice. These results suggest that Gas6 enhances the recruitment of inflammatory monocytes during venous thrombosis through regulation of CCR2 and CCL2 expression.<sup>68</sup>

In summary, CCL2 seems to have both a deleterious and a beneficial role in VTE by promoting monocyte recruitment. During thrombus formation, monocytes recruited via CCR2 favor a pro-coagulant

**TABLE 1** Preclinical studies of cytokines and chemokines in venous thromboembolism

Cytokine or chemokine	Activity in inflammation	Mechanism of action	Effect on thrombosis	References
IFN- $\gamma$	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\downarrow</math> MMP9</li> <li>• <math>\downarrow</math> neovascularization</li> <li>• <math>\uparrow</math> NET formation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\downarrow</math> thrombus resolution</li> <li>• <math>\uparrow</math> thrombus formation</li> </ul>	17-20
IL-6	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> CCL2</li> <li>• <math>\uparrow</math> CCL3</li> <li>• <math>\uparrow</math> ICAM-1</li> <li>• <math>\uparrow</math> VCAM-1</li> <li>• <math>\uparrow</math> P-selectin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> postthrombotic syndrome</li> <li>• <math>\uparrow</math> thrombus formation</li> </ul>	25,26
IL-17	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> platelet activation and aggregation</li> <li>• <math>\uparrow</math> neutrophil infiltration</li> <li>• <math>\uparrow</math> NETosis</li> <li>• <math>\uparrow</math> VCAM-1, ICAM-1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> thrombus formation</li> </ul>	35
IL-9	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> platelet function</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> thrombus formation</li> </ul>	39
IL-10	Anti-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\downarrow</math> leukocyte extravasation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\downarrow</math> thrombus formation</li> </ul>	43
IL-1 $\beta$	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> platelet aggregation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> thrombus formation</li> </ul>	49
TNF- $\alpha$	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> fibrinolysis</li> <li>• <math>\uparrow</math> collagenolysis</li> <li>• <math>\uparrow</math> neovascularization</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> thrombus resolution</li> </ul>	57
TGF- $\beta$	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> fibrosis</li> <li>• <math>\uparrow</math> endothelial dysfunction</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\downarrow</math> thrombus resolution</li> </ul>	60
CXCL8/ CXCL1	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> neutrophil recruitment</li> <li>• <math>\uparrow</math> NET formation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> thrombus formation</li> <li>• <math>\uparrow</math> thrombus resolution</li> </ul>	64-66
CCL2	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> recruitment of inflammatory monocytes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> thrombus formation</li> </ul>	68

Abbreviations: CCL2, chemokine ligand 2; IFN, interferon; IL, interleukin.

**TABLE 2** Experimental mouse models used to study cytokines and chemokines in venous thromboembolism

Animal model of venous thrombosis	Brief description	Cytokines or chemokines	References
Stasis	Complete ligation of IVC with interruption of lateral branches and cauterization of posterior branches	IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-9, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$	17,25,39,43,49,57
St Thomas	Partial ligation of IVC with application of clamps to the IVC at two locations	IL-17	35
Stenosis	Partial ligation of IVC without endothelial damage	IFN- $\gamma$ , IL-6, TGF- $\beta$ , CXCL8/CXCL1 and CCL2	18,20,26,60,66,68
Ferric chloride	Application of a filter paper soaked in a solution of FeCl <sub>3</sub> to IVC	CCL2	68

Abbreviations: CCL2, chemokine ligand 2; IFN, interferon; IL, interleukin; IVC, inferior vena cava.

milieu by expressing tissue factor, whereas in the late stage of venous thrombosis they promote thrombus resolution.

## 4 | CLINICAL PERSPECTIVES

Clinical investigators have also explored the relationship between inflammation and the risk of venous thrombosis. As reviewed by Mosevoll et al, several small case-control studies have suggested an association between the levels of cytokines to the risk of VTE.<sup>69,70</sup>

However, in a large population-based study, such association was not found.<sup>71</sup> This study even suggested that inflammation was not predictive of a future event and as such might be more a consequence of thrombosis rather than a cause. This finding should not discourage scientific investigations regarding the potential therapeutic benefit of cytokine modulation during venous thrombosis. These molecules as described in this review may be responsible for deleterious effect on the vascular wall and more specifically to the endothelium that might be involved in recurrent VTE. For example, the role of IL-17A in VTE makes this cytokine an interesting target

for clinical intervention.<sup>72</sup> Data demonstrating the role of IL-10 in modulating the interrelationship between venous thrombosis and vein wall inflammation suggest that this cytokine, once administered with an appropriate timing and dosing, could be used as a therapeutic agent in the treatment of venous thrombosis. In addition, as mentioned, one might speculate that blocking IL-1 $\beta$  could be beneficial in patients with high risk of VTE recurrence similarly to data obtained from the Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study trial.<sup>51</sup> Cytokines and chemokines may hold great promise for the implementation of novel therapeutic approaches, especially with the success of treatments using monoclonal antibodies in chronic inflammatory diseases.

## 5 | CONCLUSION

This review stressed on the intrinsic coupling between inflammation and coagulation by eliciting the role of cytokines and chemokines in thrombus formation and/or resolution (Figure 1). It has been reported that IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17, IL-9, IL-1 $\beta$ , CCL2, and TGF- $\beta$  have deleterious effects through activation of pro-inflammatory mechanisms. In contrast, TNF- $\alpha$ , when released during thrombus resolution, appears to promote production of MMPs involved in matrix degradation (Table 1). Patients diagnosed with VTE might therefore benefit from targeted treatments directed against cytokines and chemokines to obliterate thrombus formation, promote thrombus resolution, and counter future recurrence. However, a caveat in our basic understanding of cytokine and chemokine molecular mechanisms poses a major bottleneck for effective design of interventional therapies. Hence, the time course and cellular origin of cytokines and chemokines secretion during VTE remains obscure. Some discrepancies on the role of cytokines/chemokines can be explained by the absence of standardized animal model of VTE.<sup>67,68</sup> Studies reviewed here have used different VTE models and/or injection of exogenous cytokines or blocking antibodies (Table 2). Some of these data need to be revisited with our current knowledge of venous thromboembolism physiopathology and the use of tissue-specific conditional knockout models. However, it is becoming clear that, similar to other cardiovascular diseases, unresolved inflammation might be an important mechanism involved in chronic venous thrombosis (Figure 1). Although leukocyte recruitment is beneficial for thrombus resolution, the absence of inflammation dampening might be responsible for endothelial damage and vein wall remodeling. In future research, these questions need to be addressed, now that the fog starts to lift and we at least start to gain a rough impression of the tip of the iceberg, namely the involvement of cytokines and chemokines in VTE.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors state that they have no conflicts of interest.

### AUTHOR CONTRIBUTION

M. Najem, F. Couturaud, and C. A. Lemarié wrote the manuscript.

This study was supported by the Région Bretagne, Brest Métropole et Département du Finistère.

### ORCID

Francis Couturaud  <https://orcid.org/0000-0002-1855-8032>

Catherine A. Lemarié  <https://orcid.org/0000-0002-3897-4287>

### TWITTER

Catherine A. Lemarié  @CatLemarie

### REFERENCES

- Grant JD, Stevens S, Woller S, et al. Diagnosis and management of upper extremity deep-vein thrombosis in adults. *Thromb Haemost.* 2012;108:1097-1108.
- ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day. Thrombosis: a major contributor to the global disease burden. *J Thromb Haemost.* 2014;12:1580-1590.
- Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest.* 2012;122:2331-2336.
- Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: a question of attribution. *Br J Haematol.* 2008;143:180-190.
- Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood.* 2019;133:906-918.
- Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26:673-685.
- Diaz JA, Saha P, Cooley B, et al. Choosing a mouse model of venous thrombosis: a consensus assessment of utility and application. *J Thromb Haemost.* 2019;17:699-707.
- von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012;209:819-835.
- Budnik I, Brill A. Immune factors in deep vein thrombosis initiation. *Trends Immunol.* 2018;39:610-623.
- Wakefield TW, Myers DD, Henke PK. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:387-391.
- Mosevoll KA, Johansen S, Wendelbo Ø, Nepstad I, Bruserud Ø, Reikvam H. Cytokines, adhesion molecules, and matrix metalloproteases as predisposing, diagnostic, and prognostic factors in venous thrombosis. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:147.
- Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:264-274.
- Mosevoll KA, Lindås R, Tvedt THA, Bruserud Ø, Reikvam H. Altered plasma levels of cytokines, soluble adhesion molecules and matrix metalloproteases in venous thrombosis. *Thromb Res.* 2015;136:30-39.
- Ivashkiv LB. IFN $\gamma$ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2018;18:545-558.
- Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling pathways by interferon- $\gamma$ : implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity.* 2009;31:539-550.
- Villarino AV, Kanno Y, O'Shea JJ. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol.* 2017;18:374-384.
- Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, et al. Absence of IFN- $\gamma$  accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression in mice. *J Clin Invest.* 2011;121:2911-2920.
- Luther N, Shahneh F, Brähler M, et al. Innate effector-memory T-cell activation regulates post-thrombotic vein wall inflammation and thrombus resolution. *Circ Res.* 2016;119:1286-1295.
- Schönfelder T, Brandt M, Kossmann S, et al. Lack of T-bet reduces monocytic interleukin-12 formation and accelerates thrombus resolution in deep vein thrombosis. *Sci Rep.* 2018;8:3013.

20. Bertin F-R, Rys RN, Mathieu C, Laurance S, Lemarié CA, Blostein MD. Natural killer cells induce neutrophil extracellular trap formation in venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2018;17:403-414.
21. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 2015;16:448-457.
22. Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17:395-412.
23. Roumen-Klappe EM, den Heijer M, van Uum SHM, van der Ven-Jongekrijg J, van der Graaf F, Wollersheim H. Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis. *J Vasc Surg.* 2002;35:701-706.
24. Shbaklo H, Holcroft CA, Kahn SR. Levels of inflammatory markers and the development of the post-thrombotic syndrome. *Thromb Haemost.* 2009;101:505-512.
25. Wojcik BM, Wroblewski SK, Hawley AE, Wakefield TW, Myers DD, Diaz JA. Interleukin-6: a potential target for post-thrombotic syndrome. *Ann Vasc Surg.* 2011;25:229-239.
26. Zhang Y, Zhang Z, Wei R, et al. (Interleukin)-6 contributes to deep vein thrombosis and is negatively regulated by miR-338-5p. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(2):323-334.
27. Jeffrey JYU. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci.* 2008;13:170-177.
28. Hymowitz SG. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J.* 2001;20:5332-5341.
29. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:556-567.
30. Griffin GK, Newton G, Tarrilo ML, et al. IL-17 and TNF- $\alpha$  sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol.* 2012;188:6287-6299.
31. Eid RE, Rao DA, Zhou J, et al. Interleukin-17 and interferon- $\gamma$  are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2009;119:1424-1432.
32. Mo JW, Zhang D-F, Ji GL, Liu X-Z, Fan B. Detection of targets and their mechanisms for early diagnosis of traumatic deep vein thrombosis. *Genet Mol Res.* 2015;14:2413-2421.
33. Maione F, Cicala C, Liverani E, Mascolo N, Perretti M, D'Acquisto F. IL-17A increases ADP-induced platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Comm.* 2011;408:658-662.
34. Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood.* 2011;117:1400-1407.
35. Ding P, Zhang S, Yu M, et al. IL-17A promotes the formation of deep vein thrombosis in a mouse model. *Int Immunopharmacol.* 2018;57:132-138.
36. Noelle RJ, Nowak EC. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:683-687.
37. Zhang S, Yuan J, Yu M, et al. IL-17A facilitates platelet function through the ERK2 signaling pathway in patients with acute coronary syndrome. *PLoS ONE.* 2012;7:e40641.
38. Singh TP, Schön MP, Wallbrecht K, Gruber-Wackernagel A, Wang X-J, Wolf P. Involvement of IL-9 in Th17-associated inflammation and angiogenesis of psoriasis. *PLoS ONE.* 2013;8:e51752.
39. Feng Y, Yu M, Zhu F, Zhang S, Ding P, Wang M. IL-9 promotes the development of deep venous thrombosis by facilitating platelet function. *Thromb Haemost.* 2018;118:1885-1894.
40. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:271-283.
41. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med.* 2007;204:239-243.
42. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32:23-63.
43. Downing LJ, Strieter RM, Kadell AM, et al. IL-10 regulates thrombus-induced vein wall inflammation and thrombosis. *J Immunol.* 1998;161:1471-1476.
44. Schett G, Dayer J-M, Manger B. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12:14-24.
45. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013;39:1003-1018.
46. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6:232-241.
47. Dunne A, O'Neill LAJ. The interleukin-1 receptor/toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Science Signaling.* 2003;2003:re3.
48. Tyagi T, Ahmad S, Gupta N, et al. Altered expression of platelet proteins and calpain activity mediate hypoxia-induced prothrombotic phenotype. *Blood.* 2013;123:1250-1260.
49. Gupta N, Sahu A, Prabhakar A, et al. Activation of NLRP3 inflammasome complex potentiates venous thrombosis in response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:4763-4768.
50. Yadav V, Chi L, Zhao R, et al. ENTPD-1 disrupts inflammasome IL-1 $\beta$ -driven venous thrombosis. *J Clin Invest.* 2019;129:2872-2877.
51. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med.* 2017;377:1119-1131.
52. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:361-371.
53. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signalling. *Cell Death Differ.* 2003;10:45-65.
54. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:362-374.
55. Cambien B, Bergmeier W, Saffaripour S, Mitchell HA, Wagner DD. Antithrombotic activity of TNF- $\alpha$ . *J Clin Invest.* 2003;112:1589-1596.
56. Pircher J, Merkle M, Wörnle M, et al. Prothrombotic effects of tumor necrosis factor alpha in vivo are amplified by the absence of TNF-alpha receptor subtype 1 and require TNF-alpha receptor subtype 2. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R225.
57. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, et al. Contribution of the TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )-TNF-Rp55 (tumor necrosis factor receptor p55) axis in the resolution of venous thrombus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38:2638-2650.
58. Massagué J. TGF $\beta$  signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:616-630.
59. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:169-178.
60. Bochenek ML, Leidinger C, Rosinus NS, et al. Activated endothelial TGF $\beta$ 1 signaling promotes venous thrombus non-resolution in mice via endothelin-1: potential role for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2020;126(2):162-181.
61. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood.* 2000;95:3032-3043.
62. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000;12:121-127.
63. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol.* 2001;2:129-134.
64. Henke PK, Wakefield TW, Kadell AM, et al. Interleukin-8 administration enhances venous thrombosis resolution in a rat model. *J Surg Res.* 2001;99:84-91.
65. Henke PK, Varga A, De S, et al. Deep vein thrombosis resolution is modulated by monocyte CXCR2-mediated activity in a mouse model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1130-1137.
66. Yago T, Liu Z, Ahamed J, McEver RP. Cooperative PSGL-1 and CXCR2 signaling in neutrophils promotes deep vein thrombosis in mice. *Blood.* 2018;132:1426-1437.

67. Henke PK, Pearce CG, Moaveni DM, *et al.* Targeted deletion of CCR2 impairs deep vein thrombosis resolution in a mouse model. *J Immunol.* 2006;177:3388-3397.
68. Laurance S, Bertin F-R, Ebrahimian T, *et al.* Gas6 promotes inflammatory (CCR2hiCX3CR1lo) monocyte recruitment in venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:1315-1322.
69. Mosevoll KA, Johansen S, Wendelbo Ø, Nepstad I, Bruserud Ø, Reikvam H. Cytokines, adhesion molecules and matrix metalloproteases as predisposing, diagnostic and prognostic factors in venous thrombosis. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:147.
70. van Aken B, den Heijer M, Bos G, van Deventer S, Reitsma P. Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation. *Thromb Haemost.* 2000;83:536-539.
71. Christiansen SC, Næss IA, Cannegieter SC, Hammerstrøm J, Rosendaal FR, Reitsma PH. Inflammatory cytokines as risk factors for a first venous thrombosis: a prospective population-based study. Greaves M, editor. *PLoS Medicine.* 2006;3:e334.
72. Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:670-675.

**How to cite this article:** Najem MY, Couturaud F, Lemarié CA. Cytokine and chemokine regulation of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2020;00:1-11. <https://doi.org/10.1111/jth.14759>



**Titre :** Mécanismes inflammatoires induits par les cellules endothéliales dans la maladie veineuse thromboembolique.

**Mots clés :** MVTE, inflammation, endothélium, TLR3, ARNe, neutrophiles.

**Résumé :** La maladie veineuse thromboembolique (MVTE) représente la troisième cause de mortalité cardiovasculaire. Au cours de la formation du thrombus veineux, des DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) activent le système immunitaire inné en interagissant avec les PRRs (*pattern recognition receptors*). Parmi ces DAMPs, le rôle des ARN extracellulaires (ARNe) et de leur récepteur présumé TLR3 dans la thrombogénèse, reste inconnu. Mon travail vise à élucider le rôle prothrombotique de l'axe ARNe/TLR3 et la contribution du système immunitaire adaptatif aux complications chroniques de la MVTE. J'ai montré que les ARNe augmentent la taille du thrombus et le recrutement des neutrophiles chez les souris contrôles, et non pas chez celles déficientes en TLR3 (TLR3<sup>-/-</sup>). En effet, le TLR3 endothélial coordonne le recrutement des neutrophiles via la sécrétion d'IL-8 ou de l'homologue murin, CXCL5.

J'ai constaté que les ARNe augmentent la phosphorylation de NF- $\kappa$ B et l'expression d'IFN $\beta$ , uniquement dans les cellules HEK293T surexprimant le TLR3. Les ARNe participent également à la MVTE en amplifiant la coagulation via la réduction du TFPI (*Tissue factor pathway inhibitor*). Enfin, le TLR3 et l'immunité innée contribueraient aux complications chroniques de la MVTE en activant les réponses immunitaires des cellules B et T.

En conclusion, mon travail fournit une preuve de concept que l'axe ARNe/TLR3 exerce des effets prothrombotiques dans la MVTE et pourrait également conduire à ses complications chroniques. Ainsi, la dégradation des ARNe et l'inhibition du TLR3 pourraient ouvrir la voie au développement de nouvelles approches thérapeutiques adjuvantes.

**Title:** Inflammatory mechanisms induced by endothelial cell activation in venous thromboembolism.

**Keywords:** VTE, inflammation, endothelium, TLR3, eRNA, neutrophils.

**Abstract:** Venous thromboembolism (VTE) is the third leading cause of mortality among cardiovascular diseases. During thrombus formation, endogenous host-derived molecules, termed damage-associated molecular patterns (DAMPs), activate the innate immune system by interacting with PRRs (*pattern recognition receptors*). Among DAMPs, the role of extracellular RNA (eRNA) and their presumed receptor TLR3 in thrombogenesis, has not yet been elucidated. My work aims at deciphering the prothrombotic mechanisms of the eRNA/TLR3 axis and at identifying the contribution of the adaptive immune system to chronic VTE complications. I demonstrated that eRNA increase thrombus size and neutrophil recruitment in wild-type (WT), but not in TLR3 deficient (TLR3<sup>-/-</sup>) mice. Hence, endothelial TLR3 coordinates neutrophil recruitment through IL-8 secretion or its

murine homologue, CXCL5. I found that eRNA upregulate NF- $\kappa$ B phosphorylation and IFN $\beta$  expression, only in HEK293T cells overexpressing TLR3. In addition to promoting neutrophil recruitment, eRNA participate in VTE by enhancing coagulation through TFPI (*Tissue factor pathway inhibitor*) downregulation. Finally, I showed that TLR3 and other components of the innate immunity might contribute to VTE chronic complications by activating B and T cell immune responses.

In conclusion, my research work provides a proof of concept that eRNA/TLR3 axis exerts prothrombotic effects in VTE and might also lead to its chronic complications. Thus, RNA degradation and TLR3 inhibition could pave the way for the development of novel adjuvant therapeutic approaches.