



**UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**  
**ECOLE DOCTORALE : SCIENCES TECHNOLOGIE ET SANTE**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE - ARDENNE**

*Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire*

Présentée et soutenue publiquement le

15 septembre 2014

Par

**Mme LAKBAKBI Souad**

née le 14/06/1982

**Adhésion et activation des cellules sanguines par une membrane  
d'hémodialyse (AN-69ST) : conséquence sur l'expression de facteur  
tissulaire et la thrombogénicité de la membrane**

**JURY**

<b>Mr Stéphane BURTEY</b> , PU-PH, Université Aix-Marseille	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme Pascale GAUSSEM</b> , PU-PH Université PARIS 5	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr Thierry HANNEDOUCHE</b> , PU-PH Université de Strasbourg	<b>Examineur</b>
<b>Mr Jacques CHANARD</b> , PU-PH, Université de Reims Champagne-Ardenne	<b>President</b>
<b>Mr Philippe NGUYEN</b> , PU-PH, Université de Reims Champagne-Ardenne	<b>Directeur</b>
<b>Mr Philippe RIEU</b> , PU-PH, Université de Reims Champagne-Ardenne	<b>Co-Directeur</b>
<b>Mr Michel THOMAS</b> , Dr. R&D Société GAMBRO-HOSPAL	<b>Examineur</b>

*À mes Parents*

*À mon Frère Jamal*

*À Mohammed*

# **REMERCIEMENTS**

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Philippe NGUYEN, de m'avoir initié à la recherche; de la confiance qu'il m'a accordé, ainsi que l'écoute et les précieux conseils qu'il a su me donner. Merci pour votre aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit et votre disponibilité tout au long de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Phillippe RIEU, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir proposé ce projet de recherche et m'avoir fait confiance afin de le mener à son terme, merci pour vos conseils, votre rigueur et probité scientifique. Veuillez croire en l'expression de ma gratitude.

Je remercie Madame le Professeur Pascale GAUSSEM et Monsieur le Professeur Stephane BURTEY, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie Monsieur Thierry Hannedouche le Professeur pour sa participation à ce jury de thèse. Je remercie également Monsieur le professeur CHANARD, pour avoir accepté de présider ma soutenance cette thèse. Veuillez trouver dans ces quelques mots l'expression de mon respect et mon estime.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Michel THOMAS et la société HOSPAL pour le support financier et l'intérêt scientifique apportés à ce projet de recherche.

Je remercie toute l'équipe vétérinaire de Lyon pour leurs aide.

J'associe à ces remerciements le Docteur HEZARD, le Docteur CORNILLET et le Docteur DROULLE pour les discussions scientifiques enrichissantes que nous avons eu, pour leurs remarques et leurs conseils apportés au cours des réunions de laboratoire.

Un immense merci pour ma chère Valérie CREUZA, pour tous ces bons moments passés ensemble, merci pour ta gentillesse, ton sourire et les très instructives discussions sur la cytométrie de flux. Merci également pour toute les discussions en dehors du travail, merci d'avoir supporté mes critiques, tu été une grande sœur pour moi je ne t'oublierai jamais.

Je remercie également Gaël, pour son soutien depuis quelques années maintenant. J'espère que tout ce que nous avons partagé durant cette thèse ne s'arrêtera pas de si tôt (je te promets de ne plus oublier les "S"!!!!).

Un grand merci au personnel du laboratoire d'hématologie; et plus particulièrement à Murielle dit «mumu», Anne, Elodie, Lulu, la Dédéte, la Choupinette, Sylvie R, Annie, Francine dit «la Française», Béré, Marie-Christine, pour votre bonne humeur, et tous ces bons moments partagés : toutes ces choses qui ont rendu ces années de thèse plus légères. Merci Catherine pour toutes les expressions françaises que tu m'as appris..... Merci à Annick et Sylvie Daliphard pour votre gentillesse. Merci Vero pour ton amitié (je te promets de bien m'occuper des plantes!!!!).

Merci Alexandre pour ton aide et pour l'ambiance sympathique de travail.

Merci Jean pour tous les articles que tu m'as donné et les dons de sang, pour ta gentillesse et ta disponibilité (je n'oublie pas les "pastilla").

Je remercie mes amies Karima, Aida, Mounia, Najia, Loubna pour m'avoir accompagné et pour les bons moments .

Merci à l'ensemble de ma famille Karine, Mounir, Najat, Abdel, Hafid, Lamiae, Ghizou, Hssina pour leurs soutiens. Je remercie mes beaux-parents Elkbir et Louza pour avoir cru en moi.

Je dédie cette thèse à mes parents si Mohammed et Rachida, et à mon cher frère Jamal qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de croire en moi durant toutes ces années. Tout cela n'aurait jamais été possible sans vous, Mille merci.

Je ne saurai terminer sans remercier Mohammed, la personne qui partage ma vie, de m'avoir soutenu et supporté... toutes ces années. Merci de m'avoir donné Nour, qui amène un sens nouveau à ma vie.

***MERCI À TOUS...***

# **ABBREVIATIONS**

ADN : Acide Désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
Ag : Antigène  
ARNm : ARN messenger  
AT : Antithrombine  
AAV: Antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis  
Ac: Anticorps  
ACT : *Activating Clotting Time*  
BSA : Albumine Bovine Sérique  
CD : *Cluster of Differentiation*  
CG : Cathepsine G  
DNase : Deoxyribonuclease  
EDTA : Acide éthylène diamine tétracétique  
ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
ETP : *Endogenous Thrombine Potential*  
ERK : *Extracellular signal Regulated Kinase*  
FITC : Fluorescéine Isothiocyanate  
FMLP : Formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine  
FT : Facteur Tissulaire  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène  
HOCl : Acide Hypochloreux  
HNE : *Neutrophil Elastase*  
HNF : Héparine Non Fractionnée  
HBPM : Héparines de Bas Poids Moléculaire  
IL-8 : *Interleukin 8*  
IL-8RA : *Interleukin 8 Receptor A*  
IL-8RB : *Interleukin 8 Receptor B*  
kDa : Kilo Dalton  
MEK : *Mitogen-induced Extracellular Kinase*  
MAP: *Mitogen Activated Protein*

MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*  
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
NETs : *Neutrophil Extracellular Traps*  
PCR : *Polymerase Chain Reaction*  
MPO : Myéloperoxydase  
MP : Microparticule  
PAD4 : Peptidylarginine Deiminase 4  
PAF : *Platelet Activating Factor*  
PAR : *Protease-Activated Receptors*  
PE : Phycoérythrine  
PNN : Polynucleaire Neutrophile  
PS : Phosphatidylsérine  
ROS : *Reactive Oxygen Species*  
RT : Reverse Transcription  
TAT : Complexe Thrombine-Antithrombine  
TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor-alpha*  
TNFR : *Tumor Necrosis Factor-alpha* Receptor  
TM : Thrombomoduline  
TVP : Thrombose Veineuse Profonde  
TFPI : *Tissue Factor Pathway Inhibitor*  
TCA : Temps de Céphaline +Activateur  
TIH : Thrombopénie Induite par l'Héparine  
TT : Temps de Thrombine  
TQ : Temps de Quick  
VWF : Facteur von Willebrand

# SOMMAIRE

I.	PREAMBULE.....	14
II.	RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES .....	17
1.	LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES (PNN).....	17
1.1	PNN description et principales fonctions biologiques .....	17
1.2	Médiateurs de l'inflammation et activation du PNN .....	22
1.2.1	La cytokine TNF $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor alpha).....	22
a-	Structure du gène et de la protéine .....	23
b-	Récepteurs et activités biologiques.....	24
1.2.2	L'interleukine-8 (IL-8) .....	25
a-	Structure du gène et de la protéine .....	25
b-	Récepteurs et activités biologiques.....	25
1.3	PNN et hémostase .....	26
1.3.1	Expression du FT par le PNN .....	27
1.3.2	Génération de microparticules par les PNN .....	29
1.3.3	Formation des NETS .....	31
a-	Structure des NETs et phénomène de «NETOSE » .....	31
b-	Régulation des NETs .....	37
c-	NET et thrombose.....	37
d-	NET et facteur tissulaire .....	39
e-	NET, biomarqueur du risque thrombotique ?.....	40
1.3.4	Autres mécanismes potentiellement impliqués .....	40
2.	LE FACTEUR TISSULAIRE.....	42
2.1	Le gène FT .....	43
2.2	La protéine FT : structure et formes.....	44
2.3	Expression du FT par les cellules sanguines (hors PNN) .....	46
2.4	Fonctions biologiques du FT .....	47
2.4.1	Initiation de la coagulation.....	47
2.4.2	FT et signalisation .....	47
2.4.3	Autres fonctions biologiques : migration cellulaire et angiogenèse .....	49
a-	Migration cellulaire et FT.....	49
b-	Angiogenèse et FT.....	50
3.	ACTIVATION DE LA COAGULATION LORS DE L'HEMODIALYSE .....	50

3.1 Principe de l'hémodialyse .....	50
3.2 Activation intrinsèque de la coagulation lors de l'hémodialyse .....	52
3.3 Anticoagulation des circuits d'hémodialyse .....	53
3.3.1 Héparine non fractionnée (HNF).....	53
3.3.2 Héparines de bas poids moléculaires (HBPM).....	54
3.3.3 Alternatives aux HNF et HBPM .....	55
a- Fondaparinux .....	55
b- Danaparoiïde sodique .....	56
c- Inhibiteurs directs de la thrombine .....	57
d- Citrate trisodique .....	58
e- La prostacycline et les prostanoides .....	58
4. HEMOCOMPATIBILITE DES MEMBRANES D'HEMODIALYSE .....	58
III. TRAVAUX PERSONNELS .....	62
1. OBJECTIFS .....	62
2. MATERIELS ET METHODES .....	63
2.1 ISOLEMENT DES PNN DES SUJETS SAINS .....	63
2.1.1 Etude de la viabilité par un marquage au 7-AAD .....	64
2.1.2 Analyse de la pureté et du pourcentage de PNN .....	64
2.1.2.1 Principe de la technique de cytométrie en flux .....	64
2.1.2.2 Marquage des PNN et analyse de la pureté.....	64
2.1.3 Traitement des PNN purifiés à partir de témoins sains .....	66
2.1.3.1 Stimulation par TNF ou IL-8+TNF.....	66
2.1.3.2 Inhibiteurs chimiques .....	67
a- U0126 inhibition de la voie ERK1/2 .....	67
b- SB203580 .....	68
c- NAC (N-Acétyl-L-Cystéine) .....	69
2.1.3.3 Effet de l'adhésion .....	70
a- Manganèse (Mn <sup>2+</sup> ).....	70
b- Anticorps bloquants anti-intégrine $\beta$ 2 .....	70
2.2 ISOLEMENT DES PNN DU LIQUIDE PERITONEAL .....	71
a- Observation macroscopique .....	71
b- Etude cytologique .....	71
c- Analyse bactériologique .....	71
2.2.1 Purification des PNN péritonéale par une technique de tri par billes magnétiques	71



2.3 RECUEIL DES CELLULES ADHERENTES A LA MEMBRANE DE DIALYSE....	72
2.3.1 Analyse des cellules adhérentes .....	74
2.3.1.1 Phénotypage des PNN .....	74
2.4 TECHNIQUES UTILISEES .....	74
2.4.1 RT-PCR.....	74
2.4.1.1 Extraction des ARN .....	74
2.4.1.2 RT-PCR quantitative .....	75
a- Principe .....	75
b- Synthèse du brin d'ADN complémentaire (Reverse transcriptase).....	75
c- PCR quantitative.....	75
2.4.2 Analyse protéique.....	76
2.4.2.1 Extraction des protéines .....	76
2.4.2.2 Dosage protéique et préparation des échantillons .....	77
2.4.2.3 Immunoprécipitation .....	77
2.4.2.4 Immunodétection des protéines: western-blot.....	78
2.4.2.5 Dosage de l'antigène FT.....	78
2.4.3 Analyse en microscopie à fluorescence .....	79
2.4.3.1 Principe de la fluorescence.....	79
2.4.3.2 Immunomarquage.....	80
2.4.4 Mesure de l'activité FT .....	80
2.4.4.1 La thrombinographie .....	80
2.4.4.2 Test de génération de Xa.....	83
3. RESULTATS .....	85
4. DISCUSSION GENERALE .....	117
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	123
IV. ANNEXES .....	129
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	133

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Polynucléaire neutrophile en microscopie électronique .....	17
<b>Figure 2</b> : La migration trans-endothéliale des polynucléaires neutrophiles .....	20
<b>Figure 3</b> : Schéma représentatif du mécanisme oxydatif et non-oxydatif d'un PNN ayant phagocyté une bactérie .....	21
<b>Figure 4</b> : Régulation de NF- $\kappa$ B.....	23
<b>Figure 5</b> : Structure du gène de l'IL-8 humaine .....	25
<b>Figure 6</b> : Voies de transduction du signal l'IL-8 médié par CXCR1 et/ou CXCR2.....	26
<b>Figure 7</b> : <i>Neutrophil extracellular traps</i> (NETs).....	32
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique de la « NETose » avec lyse cellulaire.....	34
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique de la libération des NETs sans lyse cellulaire .....	36
<b>Figure 10</b> : Schéma de l'initiation de la coagulation par le FT .....	43
<b>Figure 11</b> : Structure du gène du FT .....	44
<b>Figure 12</b> : Structure du FT humain .....	45
<b>Figure 13</b> : Schéma de l'implication du FT dans la signalisation .....	49
<b>Figure 14</b> : Schéma représentant le principe de l'hémodialyse.....	51
<b>Figure 15</b> : Principe de l'isolement des PNN sur Polymorphprep <sup>TM</sup> .....	63
<b>Figure 16</b> : Analyse de la pureté des PNN .....	66
<b>Figure 17</b> : Protocole de stimulation des PNN par TNF ou IL-8+TNF .....	67
<b>Figure 18</b> : Protocole de traitement des PNN par les inhibiteurs chimiques.....	68
<b>Figure 19</b> : Structure chimique de l'U0126.....	68
<b>Figure 20</b> : Structure chimique du SB203580.....	69
<b>Figure 21</b> : Structure chimique du NAC .....	69
<b>Figure 22</b> : Protocole de traitement de PNN .....	70

<b>Figure 23</b> : Analyse par cytométrie en flux des cellules après tri magnétique.....	72
<b>Figure 24</b> : A: Protocole d'éluion du dialyseur. B: Observation microscopique des fibres de membrane de dialyseur avant et après rinçage par PBS.....	73
<b>Figure 25</b> : Protocole de préparation du plasma.....	81
<b>Figure 26</b> : Cinétique de génération de thrombine.....	82
<b>Figure 27</b> : Séquence proposée aboutissant à l'accumulation de FT sur la membrane d'hémodialyse .....	121

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Contenu des granules et des vésicules sécrétoires du PNN.....	19
<b>Tableau 2 :</b> Les protéines exprimées par les MP provenant de PNN.....	30
<b>Tableau 3 :</b> Stimuli induisant la formation des NETs.....	32
<b>Tableau 4:</b> La composition des NETs (d'après Brinkmann et al).....	33
<b>Tableau 5:</b> Avantages et inconvénients des HNF et des HBPM.....	55
<b>Tableau 6 :</b> Sondes et amorces Taqman <sup>®</sup> utilisées pour la PCR quantitative.....	76
<b>Tableau 7 :</b> Protocole expérimental du dosage antigénique de FT par ELISA.....	79
<b>Tableau 8 :</b> Protocole expérimental du dosage fonctionnel de FT par ELISA.....	83

# PREAMBULE

## I. PREAMBULE

L'hémodialyse, traitement ultime de l'insuffisance rénale en dehors de la greffe d'organe, concerne 1,2 millions de patients dans le monde dont 50 000 patients en France. L'hémodialyse n'est réalisable que si l'on est en mesure de prévenir la coagulation de l'ensemble du circuit extra-corporel. L'anticoagulation de référence est l'héparine, initialement non fractionnée (HNF) puis de bas poids moléculaire (HBPM). Ces médicaments sont efficaces mais associés à un risque hémorragique. C'est la raison pour laquelle des alternatives aux anticoagulations classiques ont été proposées. Parmi celles-ci, des membranes recouvertes d'héparine ont été développées mais elles ne permettent pas d'être utilisées sans aucune injection d'héparine chez la majorité des patients.

Au-delà de cet enjeu immédiat de l'anticoagulation du circuit pendant les 4 heures d'hémodialyse, il est important de comprendre les mécanismes d'activation de la coagulation chez les patients hémodialysés, afin de mieux appréhender les risques vasculaires à moyen et à long terme. En effet, il est frappant de constater l'incidence élevée d'événements cardiovasculaires chez ces patients. Il est vraisemblable que les phénomènes d'activation de l'hémostase observés à chaque hémodialyse aient un effet sur la progression de la vasculopathie associée à l'insuffisance rénale.

L'activation de la voie dite "intrinsèque" de la coagulation a été considérée pendant très longtemps comme jouant un rôle majeur dans la thrombogénicité lors de l'hémodialyse. Néanmoins, il ne s'agit pas d'une voie physiologique de l'initiation de la génération de thrombine et la thrombogénicité des circuits d'hémodialyse est observée chez les patients déficitaires en facteur XII (1). Des travaux récents suggèrent l'implication du facteur tissulaire (FT) et de la voie dite "extrinsèque" de la génération de thrombine (2).

L'objectif de ce projet est de démontrer le rôle du FT dans la thrombogénicité au cours de l'hémodialyse. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat CIFRE avec la société HOSPAL-GAMBRO, en collaboration avec les services de néphrologie et d'hématologie biologique du CHU de Reims. L'expérimentation animale a été réalisée à l'école vétérinaire de Lyon.

Nos résultats montrent que le FT joue effectivement un rôle majeur dans la thrombogénicité lors de l'hémodialyse. Ils montrent que les polynucléaires neutrophiles (PNN) activés et adhérents à la membrane de dialyse représentent la source principale de FT. Dans un modèle

animal ovin, nous montrons qu'il est possible de réaliser des séances d'hémodialyse en inhibant le FT par du FVIIa humain recombinant (fourni par la société NOVO). Des expériences menées en parallèle décrivent les mécanismes d'expression du FT par les PNN.

Après un rappel bibliographique introductif et une description des principales techniques utilisées, nos résultats sont présentés sous la forme d'un article, tel qu'il vient d'être soumis à la revue *Kidney International*, sous le titre "Tissue factor expressed by adherent cells contributes to hemodialysis-membrane thrombogenicity". Le second article rapporte un travail réalisé à partir de polynucléaires neutrophiles purifiés, provenant de liquides péritonéaux, chez des patients présentant une péritonite septique. Ces patients sont en dialyse péritonéale et la péritonite septique en est une complications sévère. Notre objectif était de mettre en évidence l'expression de FT par des PNN humains dans un modèle *ex vivo*.

Nous présentons en annexe un troisième article, publié dans la revue *J.T.T.* en 2011 (3), dont je suis co-signataire. Ce travail a été réalisé au début de mon travail expérimental. Il aborde l'expression de FT par le monocyte et l'effet combiné de l'IL-10 et du fondaparinux sur la génération de thrombine induite par le monocyte humain activé. Ma participation au travail expérimental m'avait alors permis de me familiariser avec l'exploration du FT et avec la mesure de la cinétique de génération de thrombine.

RAPPELS

BIBLIOGRAPHIQUE



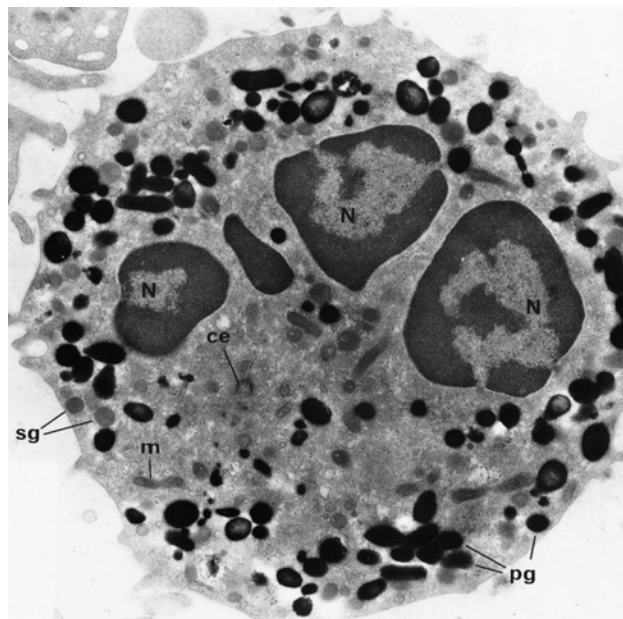
## II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### 1. LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES (PNN)

#### 1.1 Description et principales fonctions biologiques du PNN

##### Structure des PNN:

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont des leucocytes appartenant au sous-groupe des granulocytes. Ils sont caractérisés morphologiquement par un noyau polylobé et la présence de nombreux granules cytoplasmiques. Les neutrophiles constituent la plus importante population leucocytaire du sang circulant (soit 60 - 70% des leucocytes sanguins) et représentent 95% des éléments circulants de la sous-famille des granulocytes (4). Ces cellules ont une demi-vie d'environ 6 à 9h (5). Ce sont des cellules de l'immunité innée qui possèdent la capacité de migrer sur les sites inflammatoires où elles vont phagocyter et détruire des corps étrangers, utilisant un arsenal d'agents réactifs et d'enzymes protéolytiques (Figure 1).



**Figure 1 : Polynucléaire neutrophile en microscopie électronique, d'après Witko-Sarsat**

(6) N : *nucleus* (noyau), pg : *primary granules* (granules primaires ou azurophiles), sg : *secondary granules* (granules secondaires ou spécifiques), ce : centriole, m : mitochondrie.

##### Formation du PNN (Granulopoïèse) :

Les PNN dérivent des cellules de la lignée myéloblastique au niveau de la moëlle osseuse (7). La différenciation de cette lignée est complexe, contrôlée par de multiples

cytokines et facteurs de croissance, notamment l'IL-3, le GM-CSF, le G-CSF. Au niveau des tissus hématopoïétiques, le myéloblaste se différencie en promyélocyte puis poursuit sa différenciation en myélocyte, métamyélocyte, polynucléaire immature puis mature.

### **Les granules cytoplasmiques du polynucléaire neutrophile :**

Le fonctionnement des PNN dépend d'un grand nombre de molécules qui sont synthétisées puis stockées dans les granules cytoplasmiques. La formation des granules est initiée très rapidement, dès le stade de promyélocyte. On distingue quatre catégories de granules, selon leur contenu protéique et enzymatique, et leur capacité à être exocytés : les granules primaires ou azurophiles, secondaires ou spécifiques, tertiaires ou « gélatinases » et enfin les vésicules sécrétoires (8-10) :

- Les granules azurophiles (ou primaires), impliqués principalement dans la dégradation des microorganismes intracellulaires et l'élimination des pathogènes à l'intérieur des phagolysosomes, contiennent des sérines protéases : l'élastase du neutrophile (NE), la cathepsine G (CG), la protéinase 3 (PR3) (10), de grandes quantités de myéloperoxydase (MPO) et des défensines. Ils contiennent également la granulophysine (CD63) dans leur membrane.
- Les granules spécifiques (ou secondaires) contiennent des protéines de dégradation, ils ont une teneur élevée en lactoferrine (protéine hautement cationique, possédant un large spectre d'activités contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif), le lysozyme (une protéine basique, qui possède la capacité de lyser la paroi bactérienne), la gélatinase (un chélateur de fer) et ils sont dépourvus de peroxydase. Les granules spécifiques présentent à leur surface des récepteurs membranaires impliqués dans l'adhérence, notamment l'intégrine CD11b/CD18 et CD66b.
- Les granules « gélatinases » (ou tertiaires) contiennent de grandes quantités de gélatinases et des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire et des molécules permettant l'extravasation et la diapédèse du polynucléaire neutrophile (intégrines CD11b/CD18) (9).
- Les vésicules sécrétoires contiennent des récepteurs membranaires requis dans les phases précoces d'activation du neutrophile, impliqués dans le chimiotactisme et l'adhérence tels que les intégrines. Le contenu des granules et des vésicules sécrétoires du neutrophile est détaillé dans le [tableau 1](#).

<u>Azurophil granules</u>	<u>Specific granules</u>	<u>Gelatinase granules</u>	<u>Secretory vesicles</u>
<i>Membrane</i>			
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Alkaline phosphatase
CD68	CD15	Cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub>	CD10
Presenilin 1	CD66	Diacylglycerol deacetylating enzyme	CD11b/CD18
Stomatin	CD67	fMLP-R	CD13
V-type H <sup>+</sup> -ATPase	Cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub>	Leukolysin	CD14
Vitronectin-R	fMLP-R	NRAMP-1	CD16
	Fibronectin-R	SCAMP	CD45
	G-protein <sub>α</sub> -subunit	SNAP-23, -25	CR1
	Laminin-R	uPA-R	C1q-R
	Leukolysin	VAMP-2	Cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub>
	NB1 antigen	V-type H <sup>+</sup> -ATPase	Decay-accelerating factor (DAF)
	19-kDa protein		fMLP-R
	155-kDa protein		Leukolysin
	Rap1, Rap2		VAMP-2
	SCAMP		V-type H <sup>+</sup> -ATPase
	SNAP-23, -25		
	Stomatin		
	Thrombospondin-R		
	TNF-R		
	uPA-R		
	VAMP-2		
<i>Matrix</i>			
Acid β-glycerophosphatase	β <sub>2</sub> -Microglobulin	Acetyltransferase	Plasma proteins
Acid mucopolysaccharide	Collagenase	β <sub>2</sub> -Microglobulin	
α <sub>1</sub> -Antitrypsin	CRISP-3 (SGP-28)	CRISP-3	
α-Mannosidase	Gelatinase	Gelatinase	
Azurocidin	hCAP-18	Lysozyme	
BPI	Histaminase		
β-Glycerophosphatase	Heparanase		
β-Glucuronidase	Lactoferrin		
Cathepsins	Lysozyme		
Defensins	NGAL		
Elastase	uPA		
Lysozyme	Sialidase		
MPO	Transcobalamin-I		
<i>N</i> -acetyl-β-glucosaminidase			
Proteinase-3			
Sialidase, Ubiquitin-protein			

**Tableau 1 : Contenu des granules et des vésicules sécrétoires du PNN, d'après Faurchscho et al. (10).**

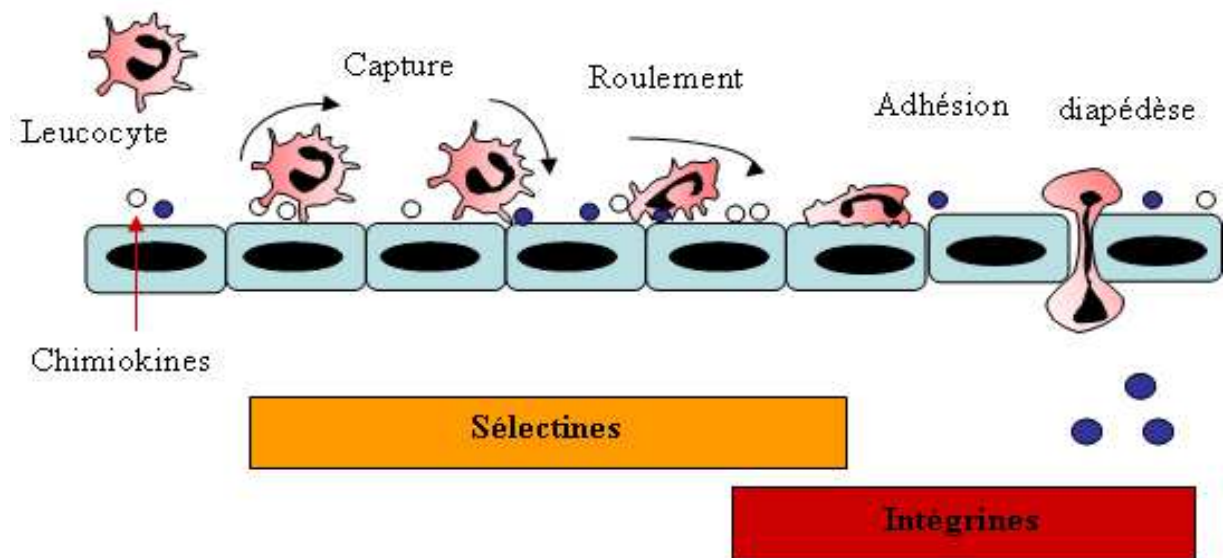
### Rôle des PNN au cours de l'inflammation :

Les neutrophiles sont les premiers leucocytes circulants à migrer sur le site de l'inflammation pour contribuer à la défense de l'organisme contre tout pathogène (11, 12). Après des étapes d'adhésion et de diapédèse, ils vont migrer jusqu'au site de l'infection, guidés par un gradient chimiotactique.

Le processus d'extravasation (Figure 2) commence par la « capture » des PNN à la surface de l'endothélium (13). Cette étape implique l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales *via* des molécules transmembranaires d'adhésion : les L-Selectines et leurs ligands, présents à la surface des cellules endothéliales.

En réponse à des signaux d'activation, les cellules endothéliales et les PNN vont modifier l'expression de ces molécules d'adhésion. Les P-Selectines et les E-Selectines sont exprimées à la surface des cellules endothéliales à la suite d'une activation inflammatoire (14).

Les PNN interagissent avec les molécules exprimées par les cellules endothéliales activées. Ces interactions ralentissent les PNN (étape de roulement (*rolling*)), qui vont ensuite adhérer fermement par des interactions de forte affinité entre les intégrines activées à la surface des neutrophiles et leurs ligands respectifs à la surface des cellules endothéliales (15) (Figure 2).



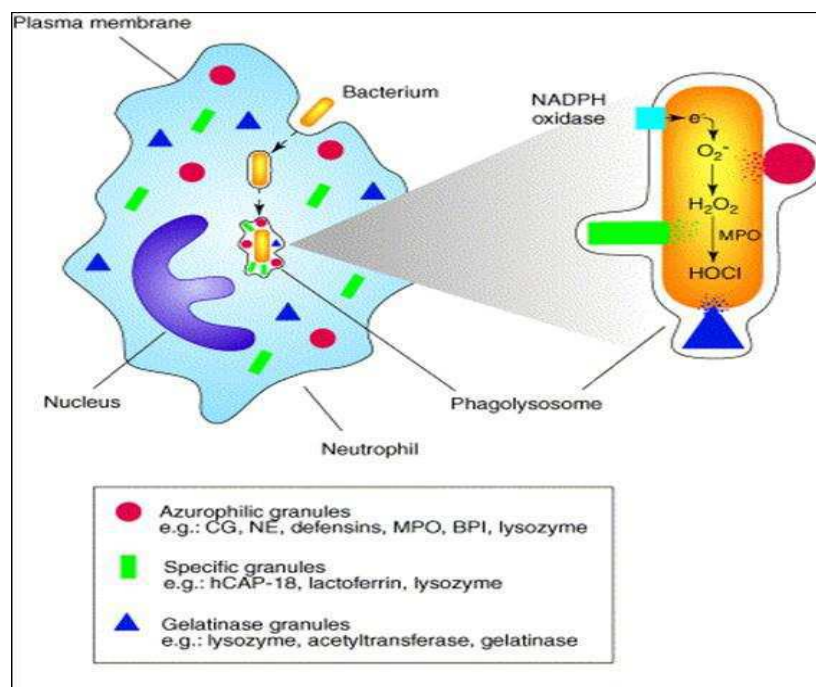
**Figure 2 : La migration trans-endothéliale des polynucléaires neutrophiles, d'après Muller et al. (16).**

Lors du *rolling*, les neutrophiles sont activés ; les intégrines présentes à leur surface changent de conformation et se redistribuent de façon à lier efficacement leurs ligands à la surface de l'endothélium. Les  $\beta$ -intégrines  $\alpha M\beta 2$  (*Macrophage antigen 1* ou Mac-1),  $\alpha L\beta 2$  (*Lymphocyte associated function antigen* ou LFA-1) et  $\alpha 4\beta 1$  (*Very late antigen 4* ou VLA-4) interagissent

avec leurs récepteurs présents sur les cellules endothéliales ; ce sont respectivement: ICAM-1, ICAM-2 (*Intercellular adhesion molecule*) et VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule*) (17). Ces interactions stabilisent l'adhésion des PNN sur l'endothélium (étape de l'adhésion ferme). Les intégrines induisent des signaux renforçant l'activation des PNN (18, 19). Puis, le cytosquelette des PNN se réorganise de façon à permettre à la cellule de migrer à travers la paroi des vaisseaux vers le tissu. Les PNN sont guidés par des gradients de molécules « chimioattractantes » (Figure 2).

Au cours de leur migration dans les tissus, les PNN sont fortement activés et sont aptes à détruire les corps étrangers, par des procédés à la fois oxydatifs et non-oxydatifs (Figure 3).

Le système non-oxydatif utilise les granules azurophiles, spécifiques et les granules « gélatinases », contenant des sérine-protéases, des protéines et des peptides antimicrobiens ainsi que des enzymes. Le deuxième mécanisme de la fonction bactéricide est un mécanisme oxydatif. Il utilise le système NADPH oxydase, lequel s'assemble à la membrane du phagolysosome et produit les anions superoxydes ( $O_2^-$ ) qui se transforment en peroxydes d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces molécules peuvent se transformer en acide hypochloreux (HOCl) sous l'effet de la MPO (20, 21). La MPO est une protéine présente dans les granules azurophiles des PNN, elle est libérée dans les phagosomes ou dans le milieu extracellulaire lors de l'activation de la cellule.



**Figure 3 : Schéma représentatif du mécanisme oxydatif et non-oxydatif d'un PNN ayant phagocyté une bactérie, d'après Mayer-Scholl et al (22).**

## 1.2 Médiateurs de l'inflammation et activation du PNN

Lors de leur activation, les PNN libèrent des médiateurs de l'inflammation comme des cytokines et/ou des chimiokines servant à communiquer avec les cellules environnantes et à recruter d'autres cellules immunitaires, amplifiant ainsi la réponse inflammatoire (23).

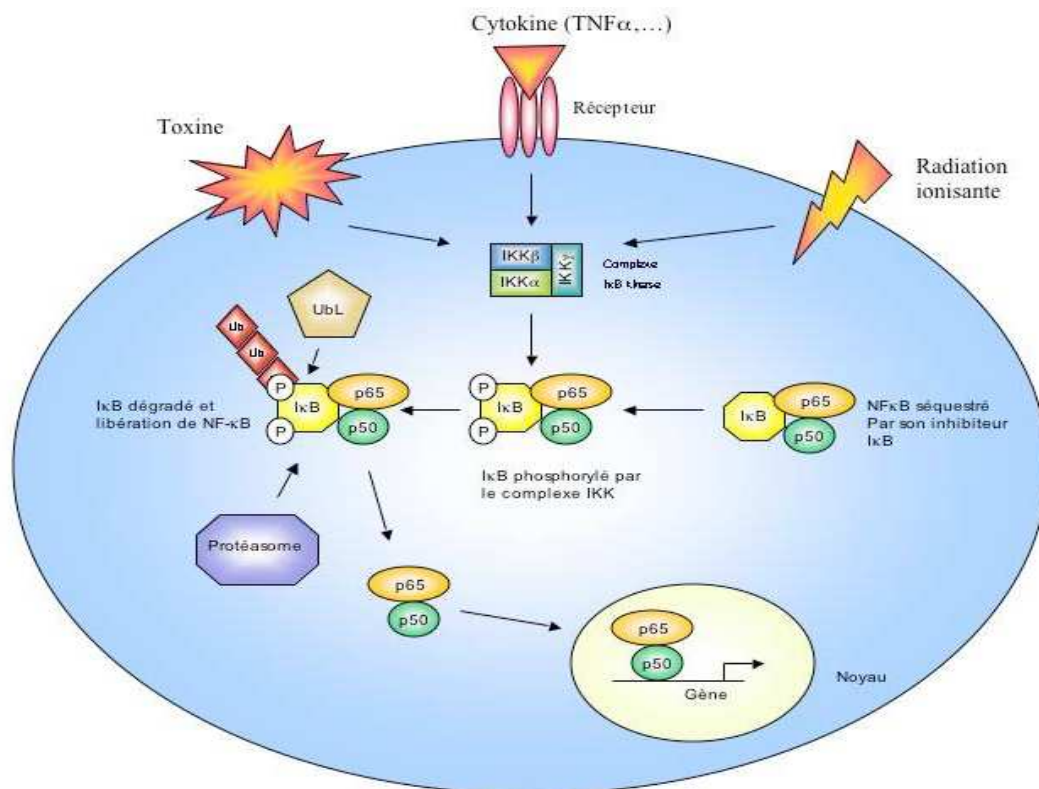
Les cytokines sont des petites protéines d'une masse moléculaire variant entre 8 à 40 kDa. Ce sont des médiateurs à court rayon d'action, ayant une fonction autocrine ou paracrine. Leur activité biologique se manifeste à très faibles concentrations, par liaison à des récepteurs membranaires spécifiques. Il existe globalement deux grandes classes de cytokines: les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires.

### 1.2.1 La cytokine TNF $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor alpha)

Le TNF $\alpha$  a été isolé en 1975 par Carswell et al., sous forme d'un facteur soluble libéré par les cellules de l'hôte ayant provoqué la nécrose d'une tumeur transplantée (24). C'est une cytokine pro-inflammatoire produite par les macrophages, les PNN, les fibroblastes, les kératinocytes, les astrocytes et les lymphocytes T et B. Il fait partie d'une famille de protéines jouant un rôle majeur dans l'inflammation, la prolifération, la survie cellulaire et l'hématopoïèse.

Le TNF $\alpha$  agit sur les récepteurs membranaires TNF-R1 (ou p55) et le TNF-R2 (ou p75) (Figure 4). Il induit des effets principalement *via* la voie impliquant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Ce facteur, sous sa forme la plus active p50 (NF- $\kappa$ B1) / p65 (Rel A), se comporte comme un puissant transactivateur et régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans le processus inflammatoire, tels que les cytokines de l'inflammation, les facteurs de croissance, des récepteurs de cytokines, des protéines de *stress* et des molécules d'adhérence leucocytaire. Dans la cellule, en dehors de toute stimulation, le complexe p50 / p65 est retenu dans le cytoplasme sous forme d'un complexe inactif avec son inhibiteur I $\kappa$ B (inhibiteur de  $\kappa$ B). Après stimulation du TNFR par le TNF $\alpha$ , l'inhibiteur I $\kappa$ B est phosphorylé par IKK (I $\kappa$ B kinase), et il sera ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Le dimère p50 / p65 ainsi libéré est transloqué vers le noyau et se lie à l'ADN au niveau de séquences spécifiques qui régulent la transcription de gènes cibles (25) (Figure 4).





**Figure 4 : Régulation de NF-κB, d'après Haefner et al (26).** NF-κB: *nuclear factor-κB*, IKK : IκB kinase, IκB : Inhibiteur de κB, Ub : ubiquitine, UbL : Ub ligase.

#### *a- Structure du gène et de la protéine*

Le gène codant pour le TNFα humain est situé sur le chromosome 6 à l'intérieur du complexe majeur d'histocompatibilité (27). La protéine TNFα est formée de trois domaines : un domaine cytoplasmique qui contient un site de phosphorylation unique sur le résidu sérine 2, un site de palmitoylation sur une cystéine du domaine cytoplasmique et deux sites de myristoylation sur les lysines 19 et 20 ; un domaine transmembranaire caractéristique des protéines transmembranaires de type II grâce auquel le TNFα s'intègre dans la membrane plasmique ; et un domaine extracellulaire qui lie les récepteurs au TNFα.

La protéine TNFα est une glycoprotéine exprimée sous deux formes : une protéine membranaire de type II de 233 acides aminés (26 kDa) et une protéine soluble de 157 acides aminés (17 kDa). La forme de TNFα soluble résulte du clivage du TNFα membranaire entre l'alanine 76 et la valine 77 par une métalloprotéinase TACE (*TNF-alpha converting enzyme*). Le TNFα est une protéine peu hydrophobe qui possède un point isoélectrique compris entre 4,7 et 5,3. Le TNFα mature forme des homotrimères de 52 kDa.

### ***b- Récepteurs et activités biologiques***

Chez l'homme, deux récepteurs membranaires distincts pour le TNF $\alpha$  ont été identifiés :

- Le TNF-R1, d'une masse moléculaire de 55 à 60 kDa, est exprimé à la surface de nombreuses cellules, dont les monocytes et les neutrophiles (28), ainsi que les cellules endothéliales (29). Il est considéré comme le récepteur le plus important dans l'initiation des activités biologiques du TNF $\alpha$ . Ce récepteur peut être activé aussi bien par les formes solubles et membranaires du TNF $\alpha$ . Le TNF-R1 est maintenu inactif par la protéine SODD (*silencer of death domain*) qui bloque l'auto-agrégation des domaines de mort (*death domain* [DD]) en l'absence de ligand, empêchant ainsi l'activation constitutive du récepteur (30).

Il existe 3 principales protéines adaptatrices liées à ce récepteur : TRADD, FADD et TRAF2. Celles-ci sont à la base des voies de signalisation intracellulaires responsables des différentes activités biologiques du TNF $\alpha$ . Plusieurs travaux indiquent que TNF-R1 possède la capacité d'induire, d'une part, un signal apoptotique et d'autre part, les voies JNK / p38MAPK et NF- $\kappa$ B. Le signal apoptotique est induit par le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (*Fas-associated death domain*) via TRADD par l'interaction entre les domaines de mort (31). La molécule TRADD est capable d'induire un signal anti-apoptique par le recrutement de la protéine adaptatrice TRAF2 (*TNF-R - associated factor 2*) et la kinase RIP (*receptor-interacting protein*) (32), lesquelles vont permettre respectivement l'activation des voies JNK / p38MAPK et NF- $\kappa$ B (33, 34).

- Le TNF-R2 est un récepteur d'une masse moléculaire de 75 à 80 kDa. Il possède une affinité pour le TNF $\alpha$  20 fois plus faible que le TNF-R1 ; il est majoritairement activé par la forme membranaire de cette cytokine (35).

Il existe des formes solubles de TNF-R1 et TNF-R2, libérées par l'action de métalloprotéinases, ou sécrétées après un épissage alternatif des ARNm. Ces récepteurs solubles (TNFRs) jouent le rôle d'inhibiteurs naturels du TNF $\alpha$  et leur servent de transporteurs.



## 1.2.2 L'interleukine-8 (IL-8)

### a- Structure du gène et de la protéine

L'IL-8 ou CXCL8, est un membre de la superfamille des chimiokines ; elle est sécrétée en grande quantité par les PNN (36). L'IL-8 est également produite par les monocytes (37), les myoblastes (38), les cellules endothéliales (39) et les cellules épithéliales (40, 41). Le gène de l'interleukine 8 est situé sur le bras court du chromosome 4 chez l'homme (42). Ce gène possède dans son promoteur les éléments de réponse aux facteurs de transcription AP-1, AP-2, IRF-1, HNF-1, NF-IL-6 et NF- $\kappa$ B (43) (Figure 5). L'IL-8 est produite sous forme d'un peptide de 72 acides aminés dérivant d'un précurseur de 99 acides aminés (après clivage d'un peptide signal) (44). La synthèse de l'IL-8 est régulée par différentes molécules, notamment les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF (45, 46).

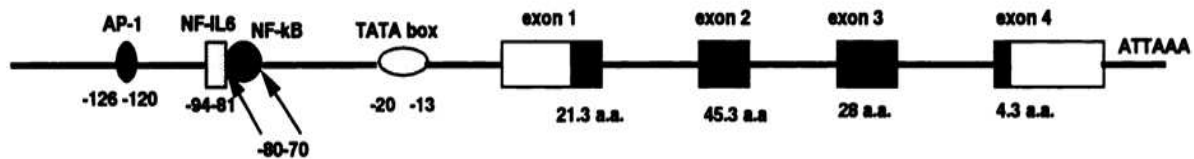


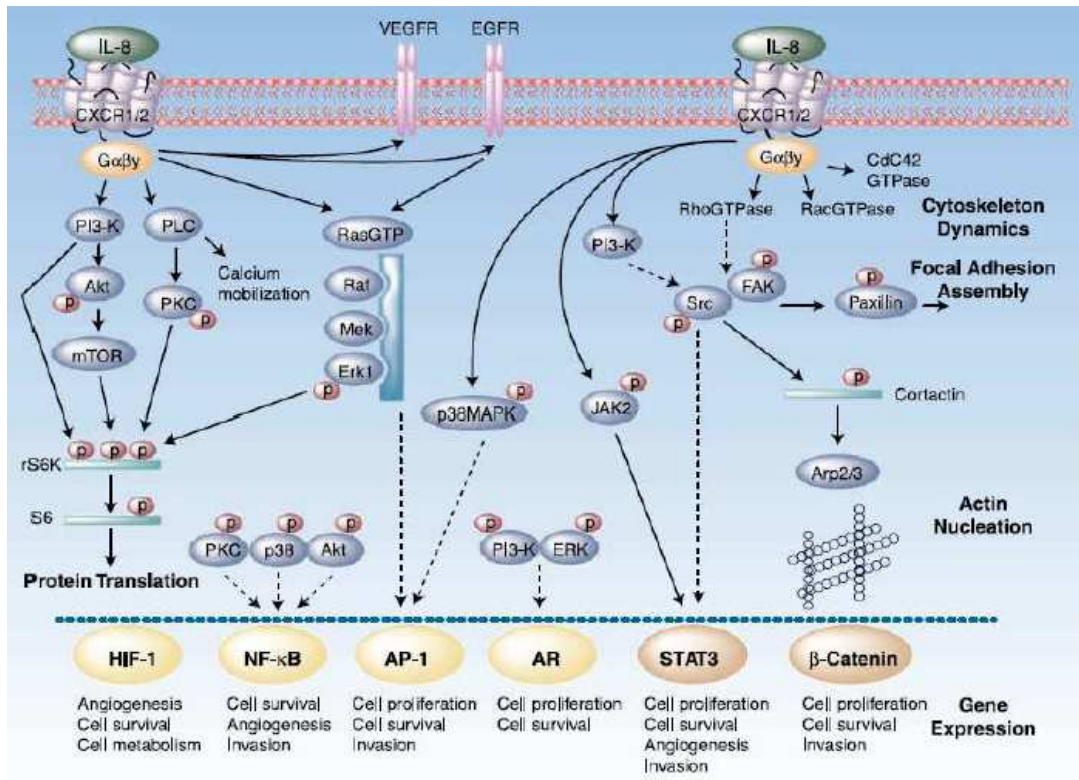
Figure 5 : Structure du gène de l'IL-8 humaine, d'après Mukaida et al (43).

### b- Récepteurs et activités biologiques

L'IL-8 cible principalement le PNN. Il exerce un effet chimio-attractant sur ces cellules mais aussi vis-à-vis des basophiles, des éosinophiles, des lymphocytes T et des cellules NK (47). L'IL-8 induit, chez le PNN, plusieurs événements importants dont la dégranulation (48), le changement de forme, la migration dirigée et l'explosion oxydative (49). Le récepteur de l'IL-8 appartient à la famille des récepteurs couplés à des protéines G (50, 51). Il en existe deux types : CXCR1 (CD181 ou IL-8RA) et CXCR2 (CD182 ou IL-8RB) (42). La fixation de l'IL-8 sur ses récepteurs induit l'activation des protéines G hétérotrimériques, lesquelles induisent l'activation du phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) ou de la phospholipase C (PLC) (52). Ces enzymes activent à leur tour Akt (53), la protéine kinase C (PKC) et/ou les cascades de signalisation des "Mitogen activated protein kinase" (MAPKs) et mobilisent le calcium intracellulaire (54).

Il a été montré que la signalisation dépendant de l'IL-8 aboutissait à une augmentation de la traduction protéique (55), à la régulation de facteurs de transcription et de l'activité

transcriptionnelle globale de la cellule cible (48). En conséquence, l'IL-8 est impliquée dans la régulation de mécanismes aussi divers que l'angiogenèse, la survie des cellules et la prolifération cellulaire (Figure 6).



**Figure 6 : Voies de transduction du signal l'IL-8 médié par CXCR1 et/ou CXCR2, d'après Waugh et al.(56).**

### 1.3 PNN et hémostasie

Les PNN jouent un rôle central dans la réponse inflammatoire (7) et sont des médiateurs cellulaires majeurs dans le "cross-talk" entre inflammation et coagulation. Les PNN sont associés qualitativement (activation) et quantitativement (hyperleucocytose) à des modèles physiopathologiques tels que les états thrombotiques associés aux états inflammatoires, notamment la thrombose veineuse, les syndromes coronaires aigus et les accidents vasculaires cérébraux (57, 58). Dans le développement de l'athérosclérose, des modèles animaux ont montré que les PNN intervenaient de façon significative dans la formation de la plaque (59). Chez les patients atteints de cancer, le risque thromboembolique veineux est associé à la leucocytose et principalement à l'augmentation des PNN (60). Au cours du sepsis compliqué de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), l'HNE (*human neutrophil elastase*) a un rôle majeur dans la dégradation / inactivation de l'antithrombine

(AT), favorisant ainsi la génération de thrombine (61). Ces différents exemples illustrent l'implication des PNN dans l'hémostase et la thrombose. L'intervention des PNN dans la coagulation de circuits extracorporels est également rapportée (62).

### 1.3.1 Expression du FT par le PNN

Alors que jusqu'alors, l'expression leucocytaire du FT était considérée comme l'apanage des monocytes, en 1999, Giesen et al. mettent en évidence par immunomarquage la présence de FT, non seulement dans la population monocytaire, mais également au niveau des PNN (63). Son modèle utilise un système de circulation de sang humain (issu de volontaires sains) en contact avec des lames recouvertes de collagène ou avec des médias artériels d'origine porcine (surfaces thrombogènes). En 2002, Imamura met en évidence par immunohistochimie dans un modèle de réaction d'Arthus chez le singe (réaction d'hypersensibilité de type III, associée à une forte accumulation de PNN), l'expression de FT sur la membrane des PNN (64). Au niveau de site de lésion cutanée, l'hybridation *in situ* met en évidence une expression d'ARNm FT dans les PNN, indiquant une synthèse *de novo*. Ce FT est fonctionnel dans la mesure où il fixe le FVIIa.

En 2006, l'équipe de Maugeri montre *in vitro*, l'expression de FT par des PNN humains hautement purifiés, après stimulation par des agonistes physiologiques tels que la P-sélectine ou la N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP). Ce FT est fonctionnel et pro-coagulant (temps de coagulation après recalcification, inhibition par un Ac anti-FT ou par un facteur VII inactivé) (65). En RT-PCR, les auteurs identifient une faible quantité d'ARNm FT dans les cellules au repos, et une augmentation après stimulation (courte = 1 heure) par la P-sélectine ou le FMLP (de l'ordre de 3 et 5 fois, respectivement).

En 2006, Ritis montre, chez les patients atteints d'APS (Syndrome des auto-anticorps anti-phospholipides), que des immunoglobulines IgG activent la fraction C5a du complément, laquelle induit la transcription du gène FT et la production de FT fonctionnel par les PNN humains (66). Chez les patients atteints de syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA ou ARDS), il a été mis en évidence une activité pro-coagulante du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA ou BALF); cette activité pro-coagulante est dépendante du FT exprimé par les PNN, et ce, sous l'effet synergique de C5a et du TNF $\alpha$  (67).

Dans l'insuffisance rénale au stade terminale, le sérum des patients hémodialysés induit la production d'un FT fonctionnel par les neutrophiles provenant de sujets sains. Cette production est dépendante de C5a, suggérant une activation du complément lors de l'hémodialyse. Cette expression du FT par les PNN en réponse au C5a, pourrait participer

au sur-risque thrombotique observé chez l'hémodialysé (2). Dans cette même étude, les auteurs montrent un effet du C5a sur l'expression du G-CSF, molécule connue pour sa thrombogénicité.

Dans un modèle de sepsis chez le singe traité par le LPS, l'ARNm (hybridation *in situ*) et la protéine FT (immunohistochimie) ont été détectés dans les PNN accumulés dans le foie ; les auteurs notent une augmentation de l'expression d'ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) par les cellules endothéliales du foie, après injection de LPS ainsi qu'une augmentation de la concentration plasmatique de TNF $\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-8. D'où l'hypothèse que l'expression de FT par les PNN implique à la fois une interaction cellules neutrophiles-endothélium *via* ICAM-1 et un environnement cytokinique pro-inflammatoire (68).

La leptine, une cytokine produite par l'adipocyte, induit l'expression de FT (ARNm et protéine) par les PNN (69). Cet effet de la leptine impliquerait la voie de signalisation intracellulaire JAK2-PI3 kinase. Dans ce modèle, la leptine favorise la production de TNF $\alpha$ , lequel pourrait favoriser la production de FT.

D'autres publications ne retrouvent pas de production de FT par les PNN. Ainsi, les travaux de Hair, en 1996, constatent l'absence d'antigène FT, d'activité FT et d'ARNm dans des PNN matures, après stimulation par le LPS (70). Osterud réfute l'hypothèse d'une production endogène de FT par les PNN, après stimulation du sang total par différents agonistes (LPS, PMA) et en appliquant des temps de stimulation très longs (jusqu'à 24h) : pour lui, les faibles traces de FT retrouvées sont à attribuer à une contamination monocyttaire (71). Nemerson, en réponse à cette conclusion d'Osterud contre-argumente, en indiquant que d'autres agonistes pourraient favoriser la synthèse de FT par les PNN dans des conditions expérimentales favorables (72).

Dans un modèle de sepsis chez la souris, on observe des amas de PNN exprimant le FT et infiltrant la rate (73). Dans ce travail, l'hybridation *in situ*, ne retrouve pas l'ARNm du FT ; les auteurs en concluent que les PNN acquièrent le FT à partir de MPs libérés par d'autres types cellulaires. Ces résultats ont été confortés par une étude suggérant que seuls les monocytes exprimaient le FT après stimulation par le LPS, avec la possibilité d'un transfert actif du FT des monocytes vers les PNN (74). Ce mécanisme de transfert du FT à partir des monocytes vers les PNN n'exclut pas la possibilité d'une production de FT par les PNN, notamment lors d'états inflammatoires.

Récemment, Darbousset et son équipe (75) ont montré, dans une étude *in vivo* chez la souris utilisant des techniques de microscopie intra-vitale, que les PNN étaient les premières cellules circulantes à se lier aux cellules endothéliales activées, et ce, dès la première seconde suivant

la lésion vasculaire. Dans cette étude, le PNN représente la principale source de FT nécessaire à la formation du thrombus. L'inhibition de l'adhésion des PNN aux cellules endothéliales, réduit la formation du thrombus et la génération de fibrine ; en parallèle, cette inhibition de l'adhésion est associée à une diminution de l'expression de FT. L'injection des PNN à des souris exprimant faiblement le FT, permet de restaurer partiellement l'activation de la coagulation (75).

### 1.3.2 Génération de microparticules par les PNN

Les microparticules (MP ou ectosomes) sont des vésicules de tailles hétérogènes, comprises entre 0,1 et 1 µm. Elles résultent du bourgeonnement de la membrane cellulaire, après activation cellulaire et lors du processus apoptotique. Elles expriment la phosphatidylsérine (PS) ainsi que différentes molécules selon la cellule d'origine, ce qui permet leur identification. Ces molécules contribuent aux multiples fonctions des MP. Les mécanismes de formation des microparticules, font intervenir un remaniement des phospholipides de la membrane plasmique et du cytosquelette permettant le bourgeonnement cellulaire.

L'activation cellulaire est associée à une élévation du taux de calcium intracellulaire. Le flux calcique inhibe d'une part l'activité de l'aminophospholipide *translocase* ; d'autre part, il active les activités *floppase* et *scramblase* (enzymes responsables du maintien de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique). Cela induit la rupture de l'asymétrie membranaire et l'externalisation de la PS (aminophospholipide concentré au niveau du feuillet interne). L'exposition de la PS et la libération de MP cellulaires, sont des événements fortement associés.

Les PNN libèrent des vésicules lorsqu'ils sont activés *in vitro* et *in vivo*, dans le cas d'une inflammation locale et systémique (76-78). Stein et Luzio ont donné le nom d'"ectosomes" aux MP libérées par les PNN après stimulation par le complément (79). Hess et al. ont montré que, lorsque les PNN sont stimulés *in vitro* par le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) ou exposés à l'ionophore calcique, ils libèrent des MP (76). Ces MP, expriment la PS et un ensemble sélectif de protéines provenant non seulement de la membrane cellulaire, mais également des compartiments intracellulaires : le récepteur 1 du complément (CR1), HLA-I, CD46, CD55 et CD59 (76). En revanche, les molécules correspondant à CD14, CD32 et CD87 ne sont pas retrouvées à la surface des MP provenant des PNN, du fait de leur faible expression ou de leur dégradation (Tableau 2) (80).

	Ectosomes	Cell membrane	Azurophilic granules	Specific granules	Gelatinase granules	Secretory vesicles	Protein type
HLA-1	+	+	-	-	-	-	TM
CR1/CD35	+	+	-	-	-	+	TM
CD11a	+	+	-	-	-	-	TM
CD11b	+	+	-	+	+	+	TM
I-selectin	+	+	-	-	-	-	TM
MCP/CD46	+	+	-	-	-	-	TM
CD66b	+	+	-	+	-	-	GPI
DAF/CD55	+	+	-	-	-	-	GPI
FcγRIII/CD16	+	+	-	-	-	+	GPI
CD59	+	+	-	-	-	-	GPI
uPAR/CD87	-	+	-	+	+	+	GPI
CD14	-	+	-	-	-	+	GPI
FcγRII/CD32	-	+	-	-	-	-	TM
MPO	+	-	+	-	-	-	Soluble
Elastase	+	-	+	-	-	-	Soluble
Proteinase 3	+	-	+	+	-	+	Soluble
MMP-9	+	-	-	+	+	-	Soluble

**Tableau 2 : Les protéines exprimées par les MP provenant de PNN, d'après Gasser et al (80).** + : présent, - : absent, **TM** : protéine transmembranaire, **GPI** : protéine liée glycosylphosphatidylinositol.

Ces MP expriment le CD62L, ce qui leur confère une capacité d'adhésion aux cellules endothéliales et aux plaquettes (81, 82). Les MP se fixent aux HUVEC et aux cellules THP-1 avec une haute affinité (83, 84) et expriment des protéines solubles, libérées par les PNN lors de la dégranulation et qui se fixent à la membrane des MP (métalloprotéinase matricielle-9, myéloperoxydase, protéinase 3, élastase). En effet, les MP issues de PNN déficientes en MPO, fixent la MPO lorsqu'elles sont incubées en présence d'un surnageant provenant de PNN non déficients ou de MPO purifiée. La membrane, chargée négativement, interagit de façon électrostatique avec la MPO cationique (80). D'autre part, il a été observé que les MP étaient capables de fixer des protéines plasmatiques, comme la fraction C3 du complément (80).

Les MP provenant de PNN sont pro-coagulants et peuvent s'associer aux MP plaquettaires : des agrégats circulants de MP provenant de PNN et de plaquettes ont été identifiés lors de vascularites aiguës et en cours d'hémodialyse (85).

Récemment, il a été démontré que les MP provenant de PNN exprimaient le FT (86). De plus, l'expression de PS favorise le recrutement des facteurs de coagulation (87).



### 1.3.3 Formation des NETS

#### *a- Structure des NETs et phénomène de «NETose »*

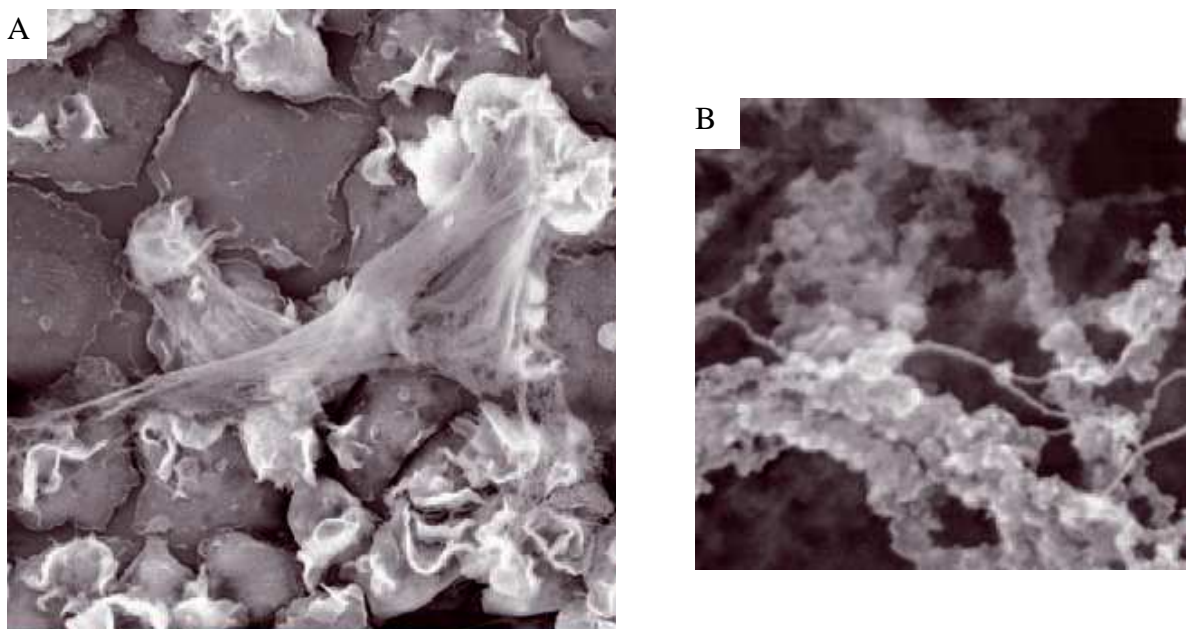
En 2004, Brinkmann et al. ont démontré que les PNN, en plus de leur capacité de phagocytose, de libération des enzymes protéolytiques, de protéines antimicrobiennes, de production d'oxydants, exercent une activité antimicrobienne par un mécanisme nouveau lié à la formation de NETs ou "*Neutrophil Extracellular Traps*" (88). Ces NETs sont formés par les PNN au contact de diverses bactéries, champignons ou plaquettes activées, ou sous l'influence de nombreux stimulus inflammatoires (89) (Tableau 3).

NET stimuli	Reference
Activated endothelial cells	<a href="#">Gupta et al. (2010)</a>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<a href="#">Bruns et al. (2010)</a> , <a href="#">McCormick et al. (2010)</a>
<i>Candida albicans</i>	<a href="#">Ermert et al. (2009a)</a> , <a href="#">Urban et al. (2009)</a> , <a href="#">Yost et al. (2009)</a> , <a href="#">Hakkim et al. (2010)</a> , <a href="#">Svobodova et al. (2012)</a>
Opsonized <i>Candida albicans</i>	<a href="#">Metzler et al. (2011)</a>
<i>Cryptococcus</i> species	<a href="#">Urban et al. (2009)</a> , <a href="#">Springer et al. (2010)</a>
<i>Escherichia coli</i>	<a href="#">Grinberg et al. (2008)</a> , <a href="#">Wang et al. (2009)</a> , <a href="#">Yost et al. (2009)</a> , <a href="#">Yan et al. (2012)</a>
f-MLP	<a href="#">Neeli et al. (2008)</a>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<a href="#">Neeli et al. (2008)</a> , <a href="#">Li et al. (2010)</a>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<a href="#">Juneau et al. (2011)</a>
IL-8+ <i>Shigella flexneri</i>	<a href="#">Wang et al. (2009)</a>
IL-8	<a href="#">Brinkmann et al. (2004)</a> , <a href="#">Gupta et al. (2005)</a>
Ca <sup>2+</sup> ionophore	<a href="#">Wang et al. (2009)</a>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<a href="#">Papayannopoulos et al. (2010)</a>
<i>Leishmania</i> species	<a href="#">Guimaraes-Costa et al. (2009)</a> , <a href="#">Gabriel et al. (2010)</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<a href="#">Ermert et al. (2009a)</a> , <a href="#">Munafò et al. (2009)</a>
LPS	<a href="#">Neeli et al. (2008)</a> , <a href="#">Li et al. (2010)</a> , <a href="#">Munafò et al. (2009)</a>
Lipoteichoic acid	<a href="#">Neeli et al. (2009)</a>
<i>Mycobacterium</i> species	<a href="#">Ramos-Kichik et al. (2009)</a>
Nitric Oxide	<a href="#">Patel et al. (2010)</a>
Platelet activating factor	<a href="#">Yost et al. (2009)</a> , <a href="#">Fuchs et al. (2010)</a>
Platelet TLR-4	<a href="#">Clark et al. (2007)</a>
Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)	<a href="#">Brinkmann et al. (2004)</a> , <a href="#">Ermert et al. (2009a)</a> , <a href="#">Munafò et al. (2009)</a> , <a href="#">Neeli et al. (2009)</a> , <a href="#">Chow et al. (2010)</a> , <a href="#">Li et al. (2010)</a> , <a href="#">Papayannopoulos et al. (2010)</a> , <a href="#">Pilszczek et al. (2010)</a> , <a href="#">Lin et al. (2011)</a> , <a href="#">Metzler et al. (2011)</a> , <a href="#">Remijsen et al. (2011b)</a> , <a href="#">Villanueva et al. (2011)</a> , <a href="#">Menegazzi et al. (2012)</a> , <a href="#">Palmer et al. (2012)</a> , <a href="#">Parker et al. (2012)</a> , <a href="#">Yan et al. (2012)</a>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<a href="#">Pilszczek et al. (2010)</a>

<i>Salmonella typhimurium</i>	<u>Brinkmann et al. (2004)</u>
<i>Shigella flexneri</i>	<u>Brinkmann et al. (2004), Li et al. (2010)</u>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<u>Brinkmann et al. (2004), Chow et al. (2010), Pilszczek et al. (2010)</u>
Opsonized <i>Staphylococcus aureus</i>	<u>Palmer et al. (2012)</u>
<i>Staphylococcus epidermidis</i> $\delta$ -toxin	<u>Cogen et al. (2010)</u>
<i>Streptococcus</i> species	<u>Beiter et al. (2006), Buchanan et al. (2006), Lauth et al. (2009), Oehmcke et al. (2009), Crotty Alexander et al. (2010), Li et al. (2010), Pilszczek et al. (2010)</u>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> $\alpha$ -Enolase	<u>Mori et al. (2012)</u>
TNF $\alpha$	<u>Neeli et al. (2009), Wang et al. (2009)</u>
<i>Toxoplasma gondii</i>	<u>Abi Abdallah et al. (2012)</u>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<u>Casutt-Meyer et al. (2010)</u>
Zymosan	<u>Neeli et al. (2009)</u>

**Tableau 3 : Stimulis induisant la formation des NETs, d'après Rohrbach et al (89).**

Les NETs constituent de véritables pièges microbiens (88). En microscopie électronique, les NETs apparaissent sous forme de filets émis à partir des PNN, et composés d'éléments linéaires d'environ 15 à 17 nm de diamètre, parsemés d'éléments ayant un diamètre de 25 à 50 nm. Ces filets semblent flexibles et entourent la cellule d'origine (Figure 7).



**Figure 7 : Neutrophil extracellular traps (NETs).** A: Microscope électronique à balayage (MEB) B: MEB haute résolution, d'après Brinkmann et al (88).



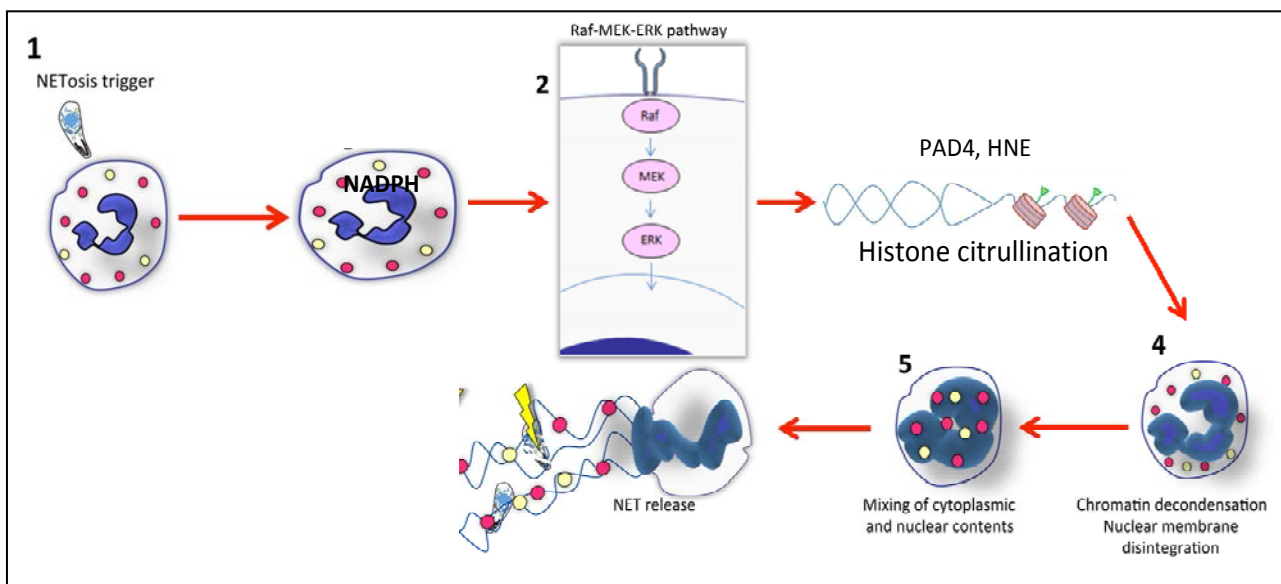
La composition des NETs a été analysée par immunofluorescence. L'ADN est la composante structurale majeure des NETs : le traitement par une deoxyribonucléase (DNase) entraîne la désintégration des filets. Les NETs contiennent les histones H1, H2A, H2B, H3 et H4 (tableau 4). Les filaments d'ADN s'associent à des protéines microbicides, provenant des granules azurophiles ou primaires (HNE, cathepsine G, myéloperoxydase). Les protéines des granules spécifiques ou secondaires et des granules tertiaires (lactoferrine, gélatinase) sont également présentes dans les NETs. L'interaction entre les protéines granulaires et la chromatine est liée à un effet de charge : les protéines granulaires retrouvées dans les NETs sont fortement cationique et présentent une avidité pour l'ADN. En revanche, CD63, une protéine de la membrane des granules, l'annexine I (marqueurs cytoplasmique), l'actine, la tubuline et diverses autres protéines cytoplasmiques ne sont pas présentes dans les NETs.

<b>Protéines</b>	<b>Provenant cellulaire</b>	<b>Présence dans NETs</b>
Elastase	Granules azurophiles	++
Myeloperoxydase	Granules azurophiles	+
Cathepsin G	Granules azurophiles	+
BPI	Granules azurophiles	+
Lactoferrin	Granules spécifiques	+
Gélatinase	Granules tertiaires	+
Histone H1	Noyau	+
Histone H2A	Noyau	+
Histone H2B	Noyau	+
Histone H3	Noyau	+
Histone H4	Noyau	+
CD63	Membrane des granules	-
Annexine I	Cytoplasme	-
$\beta$ -Catenine	Cytoplasme	-
$\alpha$ -Tubuline	Cytoplasme	-
f-actine	Cytoplasme	-
Cytochrome C	Mitochondrie	-
<b>Composante majeure</b>	<b>Provenance cellulaire</b>	<b>Présence dans NETs</b>
ADN	Noyau	+++

**Tableau 4: La composition des NETs d'après Brinkmann et al.(88).**

La formation des NETs se fait de la façon suivante : destructuration des lobes nucléaires, homogénéisation de la chromatine (fusion entre l'eucromatine et l'hétérochromatine), désintégration des membranes nucléaires et granulaires permettant la mise en contact des composants formant les NETs et enfin, extrusion des NETs dans le milieu extracellulaire, après rupture de la membrane plasmique (90, 91) (Figure 8).

Plusieurs événements nucléaires et cytoplasmiques convergent pour la libération des NETs. L'hypercitrullination des histones joue un rôle important dans la formation des NETs en induisant la décondensation de la chromatine. La citrullination est la modification d'un résidu arginine chargé positivement par une citrulline non chargée. Elle se fait *via* une enzyme, PAD4 (peptidylarginine deiminase 4) (92-94). Bien qu'il existe cinq PAD connus chez l'Homme, seule la PAD4, est impliquée dans la citrullination d'histones des PNN. Ce processus entraîne la perte de charges positives, ce qui perturbe la stabilité des interactions protéine-ADN (89) (Figure 8).



**Figure 8 : Représentation schématique de la « NETose » avec lyse cellulaire, d'après** [Abi-Abdallah et al. \(95\)](#).

Une étude récente a démontré de façon directe, chez une souris lupique, que l'inhibition chimique de PAD (par le Cl-amidine) bloquait la formation de NETs (96). Par ailleurs, des PNN isolés à partir de souris déficientes en PAD4, n'ont pas la capacité à former des NETs (92, 93). Lors de la formation des NETs, l'HNE se délocalise vers le noyau et intervient dans la décondensation de la chromatine, par clivage des histones (97).

Ce processus actif dépend d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) : cela a été montré à partir de PNN provenant de patients atteints de granulomatose chronique, lesquels possèdent une

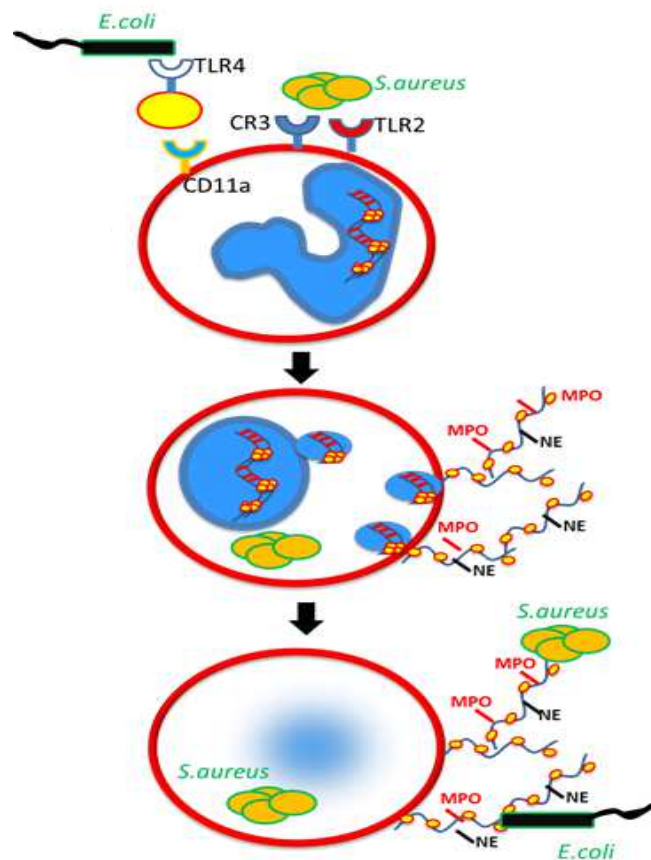
NADPH non fonctionnelle, ce qui explique leur incapacité à former des NETs après activation par le PMA (98). Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est un puissant inducteur de NETs : les PNN stimulés par le peroxyde d'hydrogène, lui-même généré par la glucose oxydase (GO), induit la formation de NETs (98). La catalase transforme l' $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$  (99) ; l'inhibition de cette catalase induit l'augmentation intracellulaire de  $H_2O_2$ , conduisant à l'augmentation de la production des NETs (98).

La MPO, en présence de  $H_2O_2$  catalyse l'oxydation de l'ion  $Cl^-$  pour produire l' $HOCl$ . Des études récentes montrent qu'en absence de la MPO, les PNN ne produisent pas de NETs (97, 100, 101). En revanche, l'addition de  $HOCl$  est suffisante pour initier la formation de NETs (102). L'inhibiteur de l'oxydase diphénylène iodonium, bloque l'explosion respiratoire ainsi que la formation des NETs. Récemment, Hakkim et al. ont montré l'implication de la voie Raf-MEK-ERK dans la formation des NETs (103).

Dans un premier temps, la production des NETs a été considérée comme une forme de mort cellulaire ou "NETose", indépendante de l'apoptose et de la nécrose (98). Puis, un nouveau mécanisme de formation des NETs sans lyse cellulaire a été décrit : il s'agit d'un mécanisme plus rapide et indépendant de la production des ROS. Ce mécanisme a été observé après stimulation des PNN par *Staphylococcus aureus* : après séparation de l'enveloppe nucléaire interne et externe, des vésicules contenant l'ADN nucléaire bourgeonnent, fusionnent à la membrane plasmique puis libèrent leur contenu dans le milieu extracellulaire sans lyse cellulaire (104) (Figure 9).

Utilisant une technique de vidéo-microscopie confocale intravitale *in vivo*, une étude récente suggère que les PNN libérant les NETs sont capables de survivre. En effet, après le début de la libération des NETs, les PNN continuent à se déplacer par chimiotaxie vers la bactérie, tout en libérant les NETs. Cette même étude montre l'implication conjointes des récepteurs Toll-like 2 et du complément dans la libération des NETs en présence de *Staphylococcus aureus*. Clark et al. ont démontré que les PNN, au contact de plaquettes stimulées par du LPS, dans des conditions de flux, restent intacts après libération de NETs (91). Cela confirme l'existence d'une voie de NETose « vitale » (sans lyse cellulaire). Bryan et al. défend ce concept, en citant l'exemple de cellules anucléées, vivantes et fonctionnelles telles que le globule rouge et la plaquette (105). Des PNN anucléées et fonctionnels, appelés "cytoplastes", ont été générés *in vitro* dans un modèle humain (106) : ces cellules, bien qu'anucléées, gardent leur capacité de chimiotaxie induite par le FMLP, d'adhésion à l'endothélium et de migration transendothéliale (107).

Une étude récente montre que des cytoplastes générés *in vitro* se déplacent de façon similaire aux PNN en cours de NETose (105).



**Figure 9 : Représentation schématique de la libération des NETs sans lyse cellulaire, d'après Yipp et al. (105).**

Les NETs possèdent donc des caractéristiques morphologiques uniques, définies par une perte de la membrane nucléaire et une disparition des organelles cytoplasmiques, alors que les PNN apoptotiques ou nécrotiques, ne présentent pas cette désintégration de l'enveloppe nucléaire, ni cette fusion du matériel nucléaire et cytoplasmique (98).

Dans la défense antimicrobienne, outre les propriétés déjà évoquées, les NETs pourraient former une barrière physique empêchant la dissémination des bactéries. Le fait de séquestrer les protéines des granules dans les NETs permettrait d'empêcher la diffusion de protéines potentiellement dangereuses comme les protéases, limitant ainsi les dommages des tissus adjacents au site de l'inflammation.

Le rôle bénéfique des NETs dans la défense contre l'infection a été clairement démontré par différents modèles expérimentaux et pathologiques déjà évoqués (108-111).

### ***b- Régulation des NETs***

L'accumulation excessive de NETs a des effets délétères, induisant des lésions tissulaires et des dysfonctionnements cellulaires. Un excès de formation de NETs a été observée au cours d'états septiques (88, 91), des pathologies inflammatoires et immunitaires ou allergiques telles que l'asthme (112), et diverses maladies auto-immunes aggravant ces pathologies (113, 114).

En pathologie vasculaire, la formation de NETs a été observée lors de pathologies thrombotiques (115-118) et athéroscléreuse (119, 120).

L'activité de la DNase endogène (nucléase plasmatique) constitue donc une contre-régulation naturelle indispensable afin d'éviter cette accumulation excessive de NETs. Des expériences ont démontré que la DNase désintérait les NETs avec un effet protecteur dans divers modèles pathologiques, notamment thrombotiques (121).

### ***c- NETs et thrombose***

Dans un modèle de thrombose veineuse profonde (TVP), chez la souris, il a été démontré que l'accumulation des leucocytes au niveau de l'endothélium veineux induisait la formation de thrombose. Ces leucocytes sont majoritairement représentés par des PNN (70%). Dans ce modèle, la déplétion des PNN prévient le développement de la thrombose, et ce, malgré la présence de monocytes. Ce résultat inattendu suggère un rôle majeur de PNN par rapport aux monocytes.

Cette même étude montre que les PNN contribuent à la thrombogénicité en formant des NETs ; l'administration de DNase, en dégradant les NETs, diminue la taille du thrombus. Les surfaces chargées négativement des NETs pourraient contribuer à l'activation du FXII, augmentant ainsi le potentiel prothrombotique des NETs. Au contraire, la déficience en FXI n'a pas d'impact sur la taille du thrombus. Cela indique que le FXIIa contribue à la thrombogénèse veineuse, indépendamment de la voie FXI. Le FXIIa pourrait moduler la formation du thrombus (121).

En effet, il a été décrit que le FXIIa modulait la structure du caillot de fibrine, et ce indépendamment de la génération de thrombine : il agit par liaison directe de son extrémité N-terminale à la fibrine (et au fibrinogène) avec pour conséquence une augmentation de la densité des fibres (122).

Une autre étude montre que l'adjonction de complexes ADN-Histones à un réseau de fibrine permet l'obtention de fibres plus épaisses, mécaniquement plus solides et plus résistantes à la fibrinolyse enzymatique (123).

Une autre étude récente, menée chez le babouin, montre l'importance des NETs dans la constitution du thrombus (116). Ces NETs, piègent les plaquettes et les érythrocytes et servent de support pour le dépôt de la fibrine et la stabilisation ultérieure du thrombus. Dans cette étude, les auteurs observent en microscopie électronique une adhésion et une agrégation plaquettaire, au contact des NETs. Les histones H3 et H4 activent les plaquettes, *via* les récepteurs TLR-2 et TLR-4.

Le facteur von Willebrand (VWF) joue un rôle important dans l'initiation de TVP (124). Ainsi, il a été décrit, dans un modèle murin, que le recrutement des plaquettes induit par le VWF était une étape-clé dans l'initiation de TVP. Dans le modèle de TVP chez le babouin (déjà décrit), l'ADN extracellulaire était co-localisé avec le VWF au niveau du thrombus (116). Dans un modèle murin de TVP, l'interaction des histones H3 citrulline avec le VWF a été proposée comme un mécanisme possible pour la formation de thrombi riches en érythrocytes (thrombus rouge) (124). Les histones augmentent l'influx de  $Ca^{2+}$  dans différents types de cellules (117). Cette augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans les cellules endothéliales et les plaquettes induit la libération de VWF (125).

En effet, la perfusion d'histones à des souris a pour conséquence l'augmentation des taux plasmatiques de VWF (124). Par conséquent, la stimulation de la sécrétion de VWF pourrait être un des mécanismes responsables de l'effet pro-thrombotique des histones. Ces histones ont également la capacité à se lier au fibrinogène et à la prothrombine (126).

Les globules rouges, présents dans le thrombus, peuvent se lier aux NETs et favoriser la coagulation par exposition de phosphatidylsérine et par modification de la viscosité du sang (116). *In vitro*, les NETs stimulent la formation et le dépôt de fibrine, ces deux éléments étant co-localisées au niveau du thrombus (121). Les NETs facilitent les co-assemblages de cathepsines G et d'HNE, et de TFPI. Cela contribue à l'inactivation de l'inhibiteur de la voie extrinsèque de la coagulation initiée par le FT (118).

Une autre étude montre que l'injection des histones est létale chez la souris et induit des lésions thrombotiques, rappelant celles du sepsis sévère (127). Les histones induisent une génération de thrombine en plasma riche en plaquettes ; cet effet est dépendant de la dose et de la présence de plaquettes, impliquant la libération de polyphosphates par les plaquettes activées. Ces polyphosphates ont été décrits comme capables d'activer le FXII (128). Néanmoins, dans le modèle proposé, l'effet des histones sur la génération de thrombine est observé en l'absence de facteur XII ou d'inhibiteur de FXIIa. Les auteurs émettent l'hypothèse



de l'implication d'autres mécanismes d'activation de la coagulation, mis en jeu lors de la présence simultanée de polyphosphates et d'histones (129).

Les histones pourraient modifier les propriétés des polyphosphates. Les histones activent d'autres fonctions plaquettaires : acquisition d'un phénotype pro-coagulant par expression de phosphatidylsérine, expression de facteur V / Va, expression de P-sélectine, agrégation plaquettaire (129).

Les histones jouent un rôle dans la modulation de la génération de thrombine : en effet, ils interagissent avec le système thrombomoduline-protéine C. Pour mémoire, la protéine C est activée au niveau de l'endothélium par le complexe protéolytique thrombine-thrombomoduline (130). La protéine C activée (PCA) inhibe la génération de thrombine, en présence de son co-facteur, la protéine S, en dégradant les facteurs FVa et FVIIIa. Les histones n'inhibent pas l'activité protéolytique de la PCA. En revanche, ils interfèrent avec l'activation de la PC par la TM. Parmi l'ensemble des histones, ce sont les histones H4 et H3 semblent avoir l'effet le plus important sur l'inhibition de l'activation TM-dépendante de la PC, avec pour conséquence une augmentation de la génération de thrombine (131).

#### *d- NETs et facteur tissulaire*

L'identification du FT au niveau des NETs est récente et les publications sont rares. Von Brühl et al. ont été les premiers à montrer, dans un modèle de thrombose veineuse chez la souris, l'expression de FT dans les NETs (121). Récemment, il a été démontré qu'au cours du sepsis, les PNN libèrent des NETs couverts de grandes quantités de FT (132). Lorsque des PNN sont incubés en présence de sérum provenant de patients présentant une septicémie, des NETs portants du FT sont observés ; cette formation de NETs portant le FT persiste, lorsque le sérum est déplété en microparticules, ce qui suggère une synthèse *de novo*. Ce FT, présent sur les NETs favorise la génération de thrombine. L'externalisation de FT serait la conséquence directe d'un mécanisme d'autophagie.

Récemment, la présence de FT au niveau des NETs a été mise en évidence dans un modèle de vascularite. Ainsi, les PNN provenant de patients présentant une vascularite associée à la présence d'anticorps anti-cytoplasme (AAV), expriment le FT à la surface des NETs, en plus du phénomène de formation de microparticules (véhiculant le FT). Des NETs exprimant le FT ont été mis en évidence dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire, ainsi qu'au niveau de dépôts intravasculaires dans l'épithélium nasal et au niveau de lésions glomérulaires. Le mécanisme de formation de NETs exprimant le FT est dépendant des immunoglobulines puisque des IgG isolées à partir de sérums de malades atteints d'AAV, induisent cette

formation de NETs exprimant le FT. Globalement, ce phénomène expliquerait le risque thrombotique chez ces patients (86).

#### *e- NETs, biomarqueurs du risque thrombotique ?*

Les NETs (ou leurs produits de dégradation) pourraient être utilisés comme biomarqueurs. Des taux plasmatiques élevés de nucléosomes, ont été mesurés lors de différentes pathologies aiguës et chroniques (133). Dans certains cas, ces taux étaient corrélés à la sévérité de la maladie (134). Une étude clinique récente, réalisée chez 282 patients, présentant une maladie coronaire, montre une corrélation entre la présence de NETs dans le plasma et l'athérosclérose coronaire. Des taux plasmatiques élevés d'ADN, de nucléosomes, des complexes MPO-ADN, et histone H4-citrulline (marqueurs de formation de NETs) ont été observés chez des patients atteints d'athérosclérose coronaire sévère ou chez les patients présentant des artères coronaires décrites comme étant « extrêmement calcifiées » (135).

La formation des NETs a également été observée dans des modèles murins de leucémie myéloïde chronique et de tumeurs solides (136). Les auteurs rapportent la présence de H3-citrulline et d'ADN, au niveau plasmatique et à des concentrations élevées. La formation des NETs pourrait donc être en cause dans la thrombogénicité associée au cancer. Dans ce travail, les auteurs rapportent que le G-CSF, cytokine produite par certaines tumeurs et dotée d'un potentiel prothrombotique, conduit à l'hypercitrullination de l'histone H3 et prédispose au phénomène de NETose des PNN.

Les NETs pourraient être utilisés comme biomarqueurs au cours du TRALI (*transfusion-related acute lung injury*), pathologie de mécanisme mal défini, mais associé à un phénomène de thrombose dans la microcirculation pulmonaire. Dans un modèle murin de TRALI, on observe, en effet, la présence abondante de NETs au niveau des lésions pulmonaires. Ces NETs activent les plaquettes et majorent les lésions pulmonaires, en augmentant la perméabilité endothéliale. Le blocage des histones réduit les dommages endothéliaux dans ce modèle de TRALI (137).

#### **1.3.4 Autres mécanismes potentiellement impliqués**

Certains dérivés de l'oxygène produits par le PNN stimulé ont une activité sur les facteurs de la coagulation ou sur les plaquettes. Les oxydants de type « chloramine » induisent un allongement des temps de coagulation (Temps de céphaline + activateur ; Temps de Quick ; Temps de Thrombine), et ce de façon dépendante de la concentration. Stief montre



que les facteurs V, X, VIII ainsi que le fibrinogène sont sensibles à l'oxydation (138). En revanche, les facteurs II, IX et XIII sont résistants.

Les plaquettes constituent une cible importante pour les dérivés de l'oxygène. De faibles niveaux d'antioxydants peuvent favoriser l'agrégation plaquettaire, alors que l'exposition à de fortes concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne une inhibition des fonctions (139).

La cathepsine G et l'HNE dégradent la fibrine et le fibrinogène (140, 141). Chez l'Homme, dans certaines pathologies telles que la leucémie à promyélocytes (142) ou la thrombose veineuse profonde (143), la présence d'HNE en quantité importante est associée à la présence de produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène. Cette capacité fibrinolytique est portée par l'HNE alors qu'elle est moindre pour la cathepsine G (144). Toutefois, la puissante activité protéolytique de ces enzymes leur permet de dégrader certains facteurs fibrinolytiques (145). Malgré cela, les auteurs estiment que l'activité fibrinolytique demeure prépondérante dans la plupart des cas.

La cathepsine G et l'élastase dégradent la prothrombine et la thrombine. La cathepsine G dégrade la prothrombine au niveau des acides aminés en position Phe 40 – Trp 41, provoquant la perte des résidus Gla, nécessaires à l'ancrage des facteurs sur les surfaces cellulaires. La présence d'ions calcium protège la prothrombine de la dégradation par la cathepsine G (146). La cathepsine G altère la thrombine ( $\alpha$ -thrombine) au niveau des acides aminés en position Trp 148 – Thr 149, générant une nouvelle forme, moins active : la  $\zeta$ - thrombine (147).

L'HNE peut agir sur l' $\alpha$ -thrombine (148), générant 2 fragments reliés par des interactions non covalentes. La thrombine, modifiée par l'HNE, conserve une activité amidolytique, mais elle est peu efficace sur le fibrinogène.

La cathepsine G et l'HNE, sont capables d'inactiver par protéolyse le FVII. La protéolyse du FVII se traduit par un allongement des temps de coagulation comparable à celui d'un plasma immunodéplété en FVII (149). Cette inactivation est la conséquence d'une dégradation des résidus Gla du FVII (150).

A l'aide de tests de coagulation, il a été montré que la cathepsine G et l'HNE inactivaient le FX, et que la présence d'ions calcium protégeait le FX de la dégradation par la cathepsine G, mais restait sans effet sur l'HNE (151). La digestion par la cathepsine G aboutit à un FX dépourvu de résidus Gla, alors que l'action de l'HNE aboutit à la formation de nombreux produits de dégradation.

Récemment, il a été montré que la cathepsine G pouvait activer le FVIII : cela a été montré dans un système de protéines purifiées (152). L'activité pro-coagulante détectée est moindre

que celle induite par la thrombine, mais elle est suffisante pour générer une activité de cofacteur.

L'HNE induit une dégradation du FIX, générant des fragments de taille similaire à celle des fragments obtenus après activation du FIX par le facteur XIa. La protéine ainsi générée n'a pas d'effets sur la coagulation (153, 154). La cathepsine G peut inactiver le FIX (150).

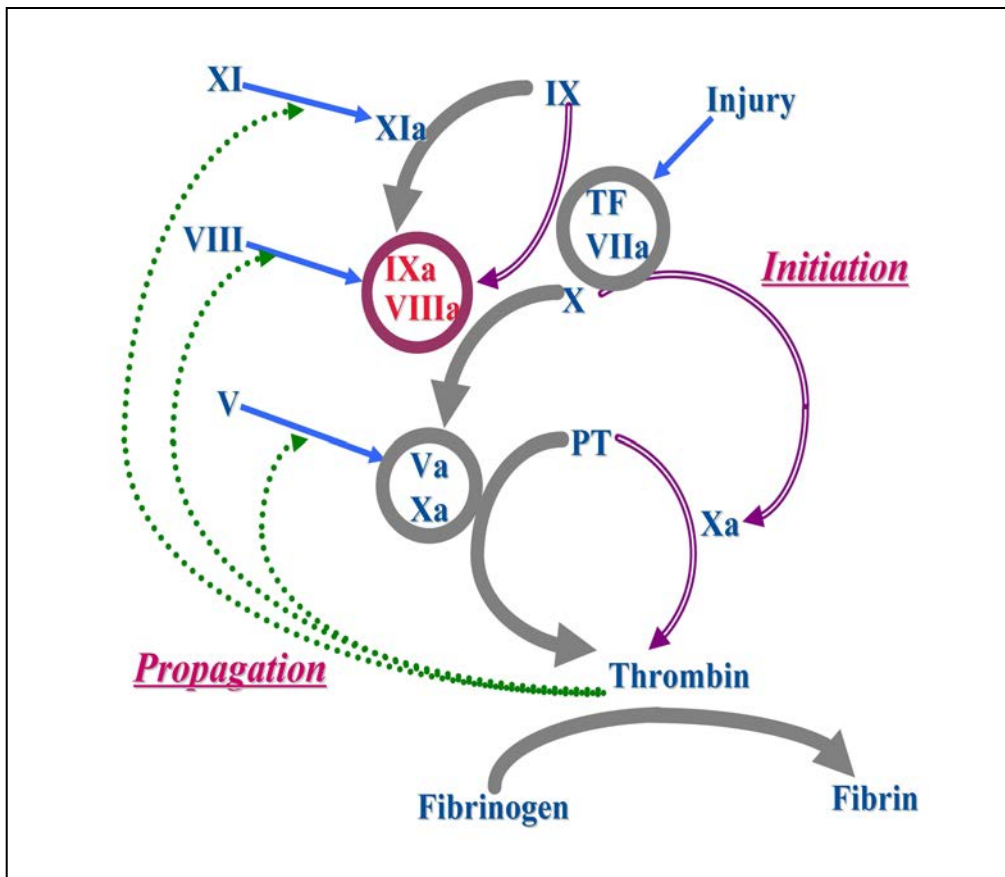
La cathepsine G et l'HNE dégradent le TFPI présent à la surface des HUVEC : cette dégradation est dépendante de la concentration enzymatique et elle est plus importante pour l'HNE que pour la cathepsine G (155). Récemment, il a été montré que les souris "KO" HNE et Cath G étaient incapables de dégrader le TFPI (118).

L'HNE est capable d'inactiver l'AT, par clivage protéolytique au niveau de la région carboxy-terminale de l'AT (156). Cette inactivation est accélérée en présence d'héparine (157). La cathepsine G peut également dégrader la protéine C (PC) (158) et la protéine S (PS) (159).

L'HNE et la cathepsine G peuvent dégrader le FXIIIa (160). Ceci amplifierait le pouvoir profibrinolytique qui leur est attribué. Toutefois, certains auteurs ont aussi montré qu'avant la dégradation du FXIIIa, l'HNE était capable d'activer le zymogène FXIII dans un premier temps, puis de l'inactiver progressivement (161).

## 2. LE FACTEUR TISSULAIRE

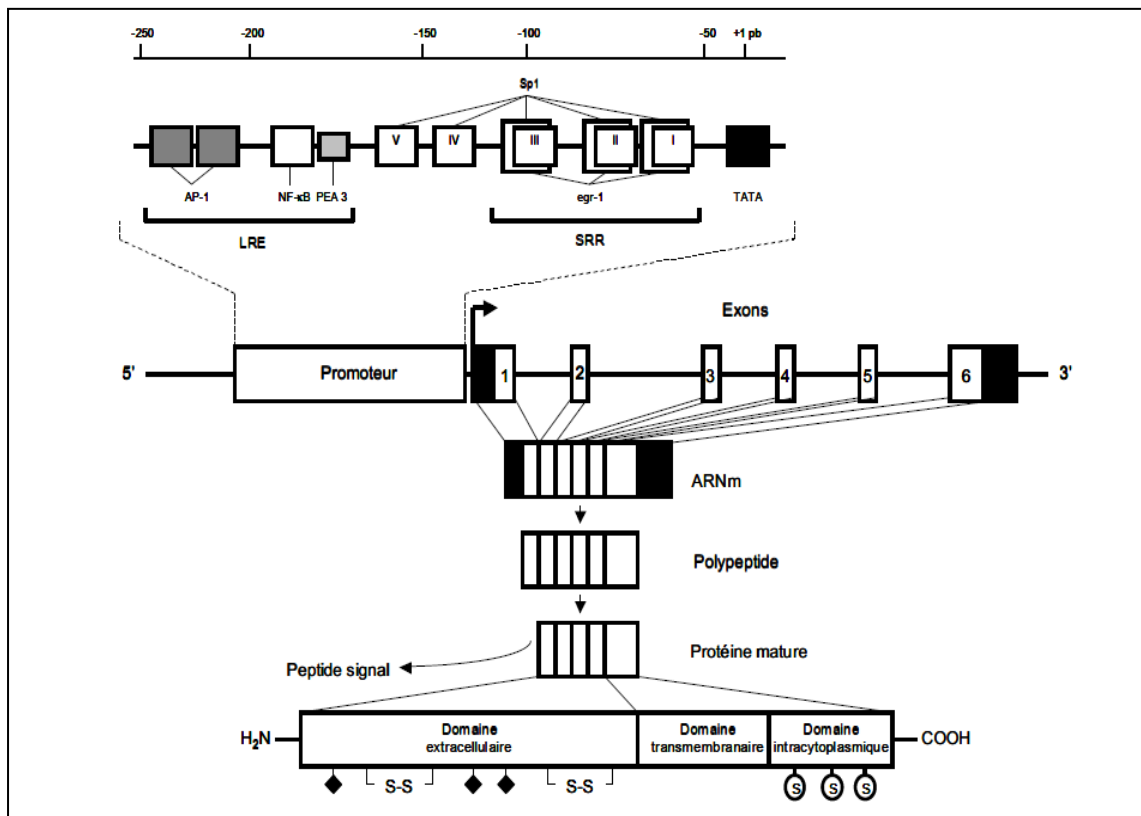
Le facteur tissulaire (FT), appelé aussi thromboplastine, facteur de coagulation III classée parmi les antigènes leucocytaires sous le *cluster* CD142. C'est une glycoprotéine transmembranaire qui, par son rôle de récepteur cellulaire des facteurs VII et VIIa, déclenche la cascade de coagulation (Figure 10).



**Figure 10:** Schéma de l'initiation de la coagulation par le FT, d'après Sheehan (162).

## 2.1 Le gène FT

Le gène du FT est situé en position 1p21-22 du chromosome 1 (163). Il est constitué de 12,4 kb et comprend 6 exons séparés par 5 introns, la région codante comporte 885 paires de bases. Le promoteur du gène FT comporte, outre une séquence TATA box, un *enhancer* proximal « Serum growth factor Responsive Region » (SRR) (164), constitué de 3 séquences Egr-1/Sp1 et de 2 autres séquences Sp1 responsables de l'expression constitutive et inducible du FT en réponse à des stimuli tels que le stress oxydatif ou le LPS (165), et un *enhancer* distal « LPS Responsive Element » (LRE), contenant 2 sites AP-1 (Activator Protein-1) et un site NF-κB. La séquence LRE régule l'expression inducible du FT après activation par le LPS, le PMA (Phorbol 12-Myrisate 13-Acetate), l'IL1β et le TNFα (166, 167) (Figure 11).



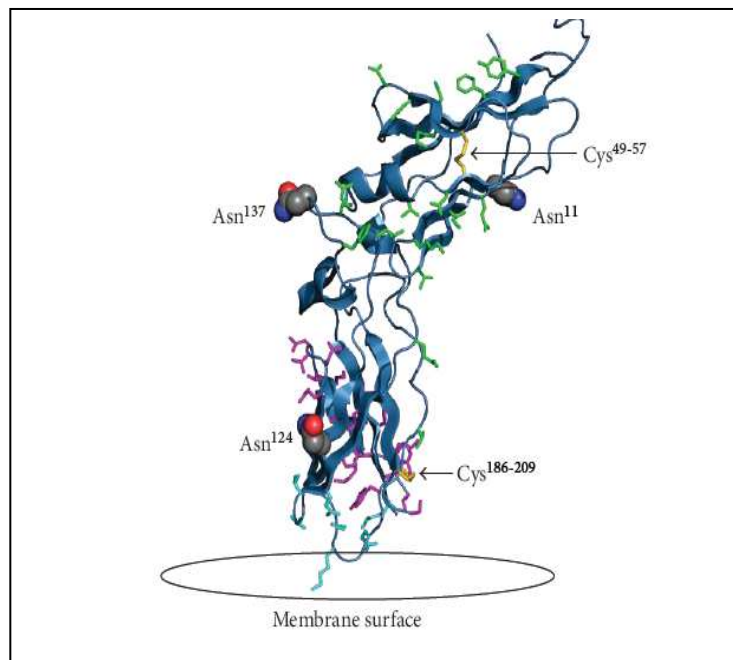
**Figure 11 : Structure du gène du FT, d'après Eilertsen et al (168).** La région promotrice est composée du LPS *Responsive Element* (LRE) et du *Serum growth factor Responsive Region* (SRR). Une partie des exons 1 et 6 n'est pas traduite (rectangles noirs). L'exon 1 code pour le peptide signal et le site d'initiation de la transcription. Les exons 2 à 5 codent pour le domaine extracellulaire. L'exon 6, dont l'extrémité 3' n'est pas traduite, code pour la partie transmembranaire et intracytoplasmique.

## 2.2 La protéine FT : structure et formes

Le FT est une glycoprotéine transmembranaire d'environ 47 kDa appartenant à la classe II de la superfamille des récepteurs des cytokines. La protéine est synthétisée sous forme d'un propeptide de 295 acides aminés (AA), la protéine mature (263 AA) étant obtenue après clivage du peptide signal. Le FT comporte un domaine extracellulaire de 219 AA, un domaine transmembranaire de 23 AA et un court domaine intracytoplasmique de 21 AA (169, 170) (Figure 12).

Le domaine extracellulaire du FT (NH<sub>2</sub>-terminal) est le récepteur du FVII de la coagulation mais également sous sa forme activée (FVIIa). Il est constitué de deux modules, module 1 (N-terminal) et module 2 (C-terminal) (171), reliés par un pont polypeptidique Proline102-Asparagine107. Le domaine extracellulaire contient 3 sites de N-glycosylation (Asn11, Asn124 et Asn137) (172). La glycosylation protège le FT de sa dégradation protéolytique (172) et

augmente son activité pro-coagulante (173). Ce domaine contient également deux domaines fibronectine de type III possédant chacun un pont disulfure, Cys49-Cys57 et Cys186-Cys209 (Figure 12). Ce dernier joue un rôle important dans l'affinité du FT pour son ligand, le FVIIa (174, 175) ; la suppression de ce pont disulfure modifie la structure conformationnelle du FT : cela provoque une perte de l'activité pro-coagulante du FT et un *switch* vers une fonction de signalisation (176).



**Figure 12 : Structure du FT humain, d'après Krudysz-Amblo et al. (177).**

Des travaux de mutagenèse ont permis de préciser que le module 2 possède un site de fixation du FVIIa « *Binding Finger* », constitué des AA Thr132 à Ser142 (178, 179). Le site de liaison du FVII se situe entre les deux modules. La région permettant la liaison des FIX et FX est composée des segments Tyr 157 à Tyr 185 et des résidus Asn 199, Arg 200 et Asp 204 (180, 181).

Des études ont montré que le domaine transmembranaire du FT, riche en AA hydrophobes, jouait un rôle important dans l'ancrage du complexe FT / FVIIa à la surface cellulaire et donc dans l'expression de l'activité pro-coagulante du FT. En effet, une molécule de FT soluble, privée de domaine transmembranaire, est incapable de lier et d'activer le FVII (182, 183). De plus, ce domaine transmembranaire est requis pour l'auto-activation du FVII (184).

Le domaine intracytoplasmique du FT est très court (21 AA) ; il est impliqué dans la transduction du signal. Il contient deux sites de phosphorylation : le site sérine 253 (Ser253),

site consensus qui implique la protéine kinase C (PKC), et le site Ser258, indépendant de la PKC (185). La fixation du FVIIa au FT entraîne la phosphorylation du résidu Ser258 et la mobilisation du calcium intracellulaire, ce qui initierait la transduction d'un signal intracellulaire (186, 187).

### **2.3 Expression du FT par les cellules sanguines (hors PNN)**

L'expression du FT par les monocytes est un modèle très bien décrit. Il a été longtemps tenu pour acquis que le monocyte, en tant que cellule en contact avec la lumière du vaisseau, n'exprimait pas de FT à l'état basal, l'expression de FT à sa surface étant obligatoirement inductible, en réponse à des stimulus divers (188, 189). En 1999, Giesen et al ont démontré l'existence d'un facteur tissulaire circulant dans le sang, qu'ils ont dénommé "*blood-borne TF*" (63). Le « *blood borne TF* » existe sous une forme encryptée, non fonctionnelle, séquestrée dans les cellules et les microparticules (190). La transformation en forme dé-encryptée du FT pourrait accompagner la transposition des phospholipides anioniques vers le feuillet externe des cellules (191). La dé-encryption pourrait être favorisée par la protéine disulfide isomérase (PDI), laquelle favoriserait l'oxydation des Cys186-Cys209 ou aurait un rôle de protéine chaperone (192). Récemment, il a été décrit que le monocyte circulant pouvait exprimer constitutivement de faibles quantités de FT, sous une forme majoritairement encryptée (193, 194).

Si l'expression de FT par les monocytes est bien établie, son expression par les plaquettes reste controversée. Il a été suggéré qu'un FT actif était présent à la surface des plaquettes activées (195-197) ; il serait synthétisé par les plaquettes elles-mêmes (198, 199).

D'autres équipes rapportent, à l'inverse, l'absence d'expression de FT par les plaquettes activées (200-202). Une étude très récente, analysant des plaquettes activées par le TRAP, l'association LPS+PMA, ou des IgG provenant de patients lupiques, montre l'absence de toute expression de FT par les plaquettes, et suggère que les conditions expérimentales (contamination par d'autres types cellulaires) d'une part, les performances des techniques utilisées d'autre part, pourraient expliquer ces discordances de résultats. Ainsi, ces auteurs ont utilisé un test fonctionnel de génération de Xa, qu'ils présentent comme une technique de choix, car elle est très sensible. Au contraire, selon ces auteurs, la cytométrie en flux pourrait s'avérer moins sensible, certains clones d'anticorps anti-FT commercialisés, étant par ailleurs d'une faible spécificité (203).

## 2.4 Fonctions biologiques du FT

### 2.4.1 Initiation de la coagulation

Le FT est un récepteur de très haute affinité pour le FVII et le FVIIa. Le FT a 2 fonctions principales :

- 1- Il est responsable de l'auto-activation du FVII en FVIIa
- 2- C'est le cofacteur du FVIIa pour l'activation des FIX et FX.

Le facteur VII est un zymogène (FVII) : une forme monocaténaire majoritaire se présente dans la circulation sous forme non active. La forme activée (FVIIa) bicaténaire, partiellement activée (*zymogen-like*) n'est présente qu'à l'état de trace, dans la circulation sanguine (~ 1 % du FVII circulant). L'activation du FVII nécessite le clivage protéolytique de la liaison Arg152-Ile153 du domaine catalytique du FVII, et la formation d'un pont salin entre la nouvelle extrémité N-terminale Ile153 et le résidu Asp343 du site actif (204, 205). Ce pont salin serait absent dans la forme FVIIa *zymogen-like*, d'où une activité catalytique quasi nulle. En fait, seule son association avec le FT lui confère une activité catalytique.

La liaison du FVIIa au FT entraîne des changements conformationnels du FVIIa et favorise la formation du pont salin et l'activation allostérique complète du FVIIa (205, 206). Le FVIIa, ainsi complètement activé, permettrait la protéolyse de son zymogène le FVII au sein du complexe FT-FVII (auto-activation) (207).

Le FT joue également un rôle de cofacteur pour le FVIIa dans l'activation des facteurs FX et FIX, augmentant considérablement son activité protéolytique vis-à-vis de ces substrats (208). En effet, le FT permet de stabiliser le site actif du FVIIa (particulièrement le résidu catalytique Ser344) et de le positionner à une distance d'environ 75 Å de la membrane (204, 209), position indispensable pour l'activation des facteurs FX et FIX par le FVIIa (207). L'activation du FX et FIX par le FT-FVIIa est dépendante des ions  $Ca^{2+}$  et des phospholipides (210).

### 2.4.2 FT et signalisation

Le FT est impliqué dans de nombreux processus biologiques : hémostase, migration et adhésion cellulaire, angiogenèse et signalisation.

Le mécanisme d'action du FT est très complexe. Il agirait par une signalisation dépendante de l'activité catalytique du complexe FT-FVIIa ou FT-FVIIa-FXa. Cette voie impliquerait

l'activation des récepteurs PAR2 (PAR : *protease-activated receptors*) par le FVIIa au sein du complexe FT-FVIIa (Figure 13).

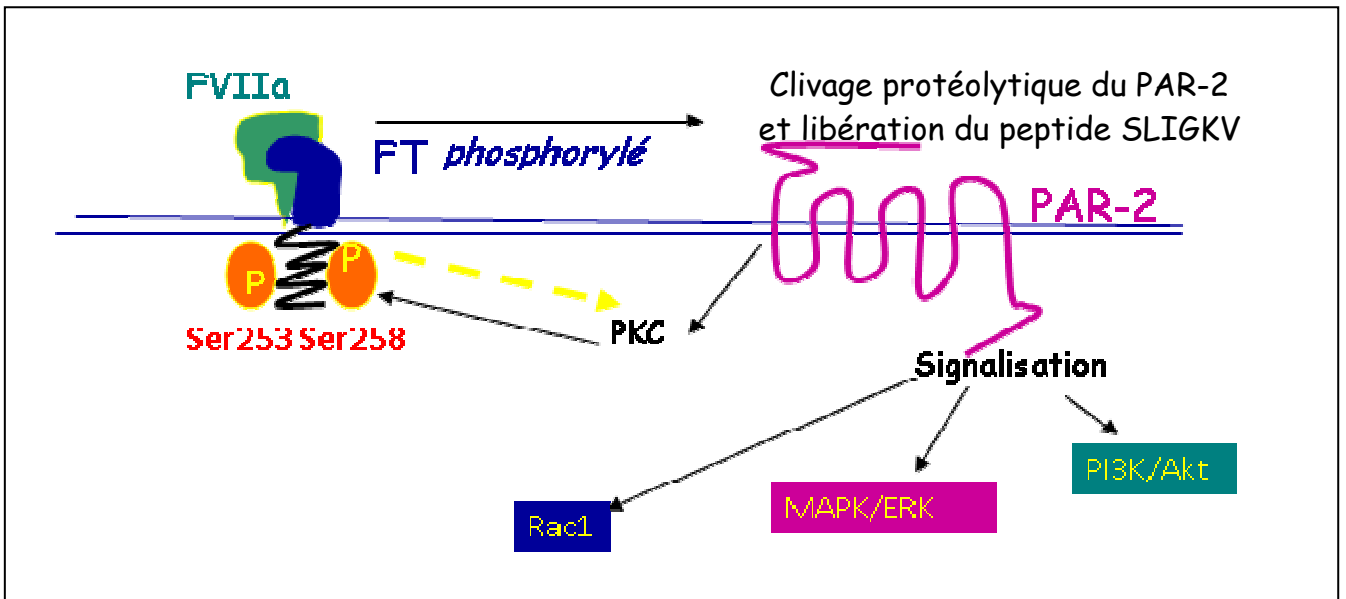
Les PAR sont des récepteurs cellulaires composés de 7 domaines transmembranaires, couplés à des protéines G. Les PAR sont activés par les sérine-protéases, après clivage de leur extrémité N-terminale. Cette activation est irréversible.

Dans des lignées de cellules cancéreuses, l'inhibition de PAR2 inhibe la signalisation induite par le FT-FVIIa (211, 212). PAR2 serait également activé par le complexe ternaire FT-FVIIa-FXa. L'activation de PAR2 par les complexe FT-FVIIa ou FT-FVIIa-FXa déclenche une signalisation, laquelle pourrait activer la phosphorylation du domaine intracytoplasmique du FT (213, 214).

Une étude récente *in vivo* rapporte l'implication de la voie FT-PAR2 dans la croissance de tumeurs, impliquant une phosphorylation du FT induite par PAR2 (215). La liaison FT-FVIIa entraîne un clivage protéolytique de PAR2 et la phosphorylation du domaine intracytoplasmique du FT *via* la Phospholipase C et la PCK $\alpha$  (213), ce qui régule négativement la signalisation induite par PAR2 (214). En effet, le FT délété du domaine cytoplasmique chez la souris entraîne une augmentation de l'angiogenèse PAR2-dépendante (214).

Une autre voie de signalisation induite par le FT est initiée par la phosphorylation du domaine intracytoplasmique du FT (216). Par une méthode spectroscopique, il a été démontré que la phosphorylation de la Ser258 et Ser253, favorise une conformation structurale particulière du domaine intracytoplasmique (185) et régule potentiellement son association avec la membrane cellulaire et ses partenaires de signalisation (Figure 13).





**Figure 13 : Schéma de l'implication du FT dans la signalisation**

### 2.4.3 Autres fonctions biologiques : migration cellulaire et angiogénèse

L'hémostase et l'angiogénèse sont étroitement liées par l'intermédiaire de la thrombine qui joue un rôle dans la migration cellulaire et la libération de facteurs pro- et anti-angiogéniques (217). Par définition, l'angiogénèse implique des propriétés migratoires cellulaires.

#### *a- Migration cellulaire et FT*

Le FT stimule la migration *via* une voie de signalisation indépendante de l'activité protéolytique du FVIIa, et dépendante du domaine intracytoplasmique du FT. Cette voie implique l'activation de p38 MAPK et Rac1. Ce nouveau lien peut fournir un aperçu de la compréhension des fonctions non-hémostatiques du FT (216). Il a également été montré que le FT est un puissant facteur de chimiotactisme pour les cellules musculaires lisses vasculaires (CML ou SCMs). La capacité d'induction de la migration par le FT est comparable à celle induite par un facteur hautement chimiotactique : le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*). L'usage de l'anticorps monoclonal anti-FT induit une inhibition de migration des SCMs (218). Il a été montré que la liaison du FVIIa au FT conduisait au chimiotactisme des fibroblastes humains en réponse au PDGF (*Platelet-Derived GrowthFactor*) (219). Cette dernière équipe a également montré que le complexe FT / FVIIa stimulait la migration des fibroblastes humains, indépendamment du FXa et de la thrombine.

Récemment, il a été montré que l'expression constitutive de FVIIa favoriserait l'invasion et la migration d'une lignée tumorale de cellules ovariennes. La motilité accrue, bloquée par des anticorps anti-FT monoclonaux et par des anti-PAR-1, confirme que le complexe TF / FVIIa stimule la migration en déclenchant la signalisation cellulaire (220).

### ***b- Angiogenèse et FT***

Un déficit total en FT n'est pas viable. Plusieurs équipes ont créé une souris délétée pour le gène du FT (221, 222). Les embryons mFT<sup>-/-</sup> meurent *in utero* à 10,5 jours de développement par hémorragie et désorganisation importante de la vascularisation du sac vitellin. Le mécanisme en est un défaut de développement de la couche musculaire entourant les tubes de cellules endothéliales du vaisseau primitif. L'absence de FT semble affecter la structure des vaisseaux plutôt que la différenciation des cellules endothéliales (217). Les mécanismes par lesquels le système FT-FVII modifie l'angiogenèse semblent dépendants de la signalisation intracellulaire du FT (186, 223). Les embryons mFT<sup>-/-</sup>, hTF<sup>+</sup> chez lesquels une petite activité FT est restaurée par un petit gène contenant le promoteur et l'ADNc humains du FT, ce qui permet ainsi de retrouver 1% d'activité FT, survivent sans hémorragie du sac vitellin (224). En revanche, dans ce modèle, le gène du FT délété du domaine extracellulaire ne permet pas la survie de ces embryons (225).

Ces travaux mettent en évidence le rôle-clé du FT dans l'embryogénèse et le développement vasculaire. La partie extracellulaire du FT, qui lie le FVII, est absolument nécessaire à l'embryogénèse des vaisseaux, comme l'ont montré différents modèles de souris génétiquement modifiées pour les parties extra ou intracellulaires du FT (225). Par ailleurs, des inhibiteurs spécifiques du complexe FT-FVIIa-FXa et du FXa seul ont montré que le processus angiogénique est dépendant du FVIIa mais pas du FXa (226).

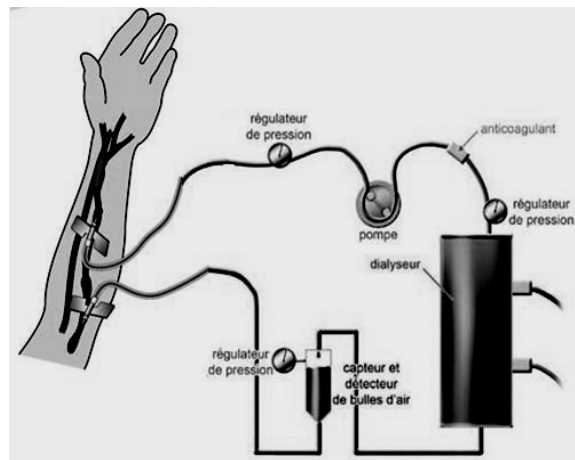
## **3. ACTIVATION DE LA COAGULATION LORS DE L'HEMODIALYSE**

### **3.1 Principe de l'hémodialyse**

La dialyse est un système d'épuration extra-rénale du sang. Elle repose sur l'échange entre le sang du patient et une solution de dialyse de composition proche de celle du liquide extracellulaire physiologique au travers d'une membrane semi-perméable.

A partir d'un abord vasculaire (fistule artério-veineuse ou cathéter veineux central), le sang est acheminé dans le circuit jusqu'au dialyseur, grâce à une pompe, assurant un débit de l'ordre de 400 à 300 mL/min. Après épuration, le sang est restitué au patient, en passant dans un

piège à bulles, afin d'éviter la présence d'air dans le circuit. Le contrôle de pression se fait avant et après le dialyseur (Figure 14).



**Figure 14 : Schéma représentant le principe de l'hémodialyse.**

Le dialyseur (Figure 14), « rein artificielle », est le support où se produisent les échanges. Il est composé d'une membrane semi-perméable qui sépare le compartiment sanguin du dialysat. Il en existe deux types : les dialyseurs à plaques et les dialyseurs à fibres creuses. Dans les dialyseurs à fibres creuses, le sang s'écoule à l'intérieur du dialyseur dans un sens tandis que le dialysat le traverse à contre-courant et à l'extérieur des fibres. Le principe des échanges à travers la membrane semi-perméable se fait selon 3 mécanismes:

- 1- La diffusion : elle constitue le principal mécanisme de l'hémodialyse. Elle permet le transfert passif des solutés, sans passage de solvants, selon un gradient de concentration (de la solution la plus concentrée vers la solution la moins concentrée) et ce jusqu'à l'équilibre. Ce transfert peut se faire du sang vers le dialysat (urée, créatinine, potassium....) ou du dialysat vers le sang (bicarbonate, calcium...).
- 2- L'ultrafiltration : elle permet le transfert de l'eau et d'une fraction de son contenu en solutés, sous l'effet d'une différence de pression hydrostatique de part et d'autre de la membrane.
- 3- L'adsorption : c'est un mode d'épuration propre à l'hémodialyse. Les protéines ne traversent pas la membrane de filtration et s'adsorbent à la membrane. C'est le cas pour l'albumine, la fibrine, certaines cytokines, dont le TNF- $\alpha$ , qui peuvent ainsi être éliminées. L'adsorption dépend du degré d'hydrophobicité de la membrane.

### 3.2 Activation intrinsèque de la coagulation lors de l'hémodialyse

L'étape initiale qui déclenche la coagulation dans le circuit de dialyse reste en grande partie ignorée. L'activation de la coagulation se fait essentiellement dans le dialyseur (227). Il constitue plus de 90% de la surface totale de circuit de dialyse. Le contact du sang avec les membranes artificielles est susceptible d'activer le facteur XII (FXII) du système contact et de déclencher ainsi la voie dite « intrinsèque » (ou « endogène ») de la coagulation plasmatique. La membrane de polyacrylonitrile de dialyse (avec un potentiel électrique de surface zeta à  $-70 \pm 5$ ) fixe et active les protéines du système contact (FXII et kallikréine) (228). Le passage de sang total *in vitro* à travers un dialyseur AN69 induit une activation importante de la coagulation associée à une génération de facteur XII activé (FXIIa) (229). Dans ce système, l'activation de la coagulation est considérablement diminuée lorsque le sang provient de patients déficients en FXII. Cependant, l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation ne semble pas intervenir pour des membranes moins électronégatives.

En effet, le passage de sang total *in vitro* à travers un dialyseur composé de membrane polysulfone (potentiel zeta à  $-51$ ) ou de cuprophane (potentiel zeta à  $-10 \pm 1$ ) induit l'activation de la coagulation (évaluée par la génération de complexes thrombine-antithrombine) sans génération de FXIIa (229). De même, Burman et al. ont décrit une génération normale de thrombine, lors d'une séance de circulation extracorporelle réalisée chez une patiente totalement déficiente en FXII (1). L'ensemble de ces arguments indique que le déclenchement de la coagulation se fait indépendamment du système contact, pour la majorité des dialyseurs composés de membrane faiblement électronégative.

Des études ont montré une faible génération de thrombine ou de complexes thrombine-antithrombine (TAT) lorsque les biomatériaux sont mis en contact avec un plasma non dilué (230, 231). En outre, des taux élevés de kallikréine et de FXII adsorbés sur les biomatériaux, ne sont pas associés à une élévation des complexes TAT : cela suggère que les protéines de la phase contact jouent un rôle direct mineur, dans l'activation de la coagulation.

Une étude menée par Hong et al. dans un modèle *in vitro* utilisant un biomatériau en chlorure de polyvinyle (PVC) (232), montre que seul le sang total est capable de générer de grandes quantités de thrombine alors que le plasma, qu'il soit pauvre ou riche en plaquettes, n'a pas (ou peu) d'effet. Cela suggère que la présence de leucocytes est nécessaire à l'activation de la cascade de coagulation.

### 3.3 Anticoagulation des circuits d'hémodialyse

Le circuit extracorporel d'hémodialyse nécessite une anticoagulation, utilisant l'héparine non fractionnée (HNF), les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) ou d'autres anticoagulants.

#### 3.3.1 Héparine non fractionnée (HNF)

- **Rappels pharmacologiques**

L'HNF est constitué de polysaccharides sulfatés, de masses moléculaires variant de 4 à 40 kDa (233). Chaque molécule est constituée d'un enchaînement d'unités disaccharidiques, formées d'une molécule d'acide pyranosylurique et d'une molécule de 2-amino-2-deoxyglucopyranose. Au sein de ces chaînes, figure un pentasaccharide, responsable de la liaison à l'antithrombine (AT).

L'HNF inhibe les sérines protéases de la coagulation (principalement le facteur Xa et la thrombine) par l'intermédiaire de l'AT. En effet, la liaison HNF-AT induit un changement conformationnel de l'AT, lequel expose la boucle présentant le site réactif Arg-Ser 393-394. L'HNF multiplie d'un facteur de 300 à 1000 la cinétique d'inhibition des sérines protéases par l'AT (234, 235). Son action principale anticoagulante est indirecte. Les molécules d'HNF se fixent à l'antithrombine et potentialisent son effet anti-Xa et anti-IIa. L'antithrombine inactive la thrombine (FIIa) et le facteur Xa, et, à un niveau plus faible, les facteurs IXa, XIa et XIIa.

L'HNF possède également la propriété de mobiliser le pool endothélial de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (*Tissue Factor Pathway inhibitor* ou TFPI). Le TFPI est principalement produit par l'endothélium où il se lie à un glycosaminoglycane : l'héparane sulfate. Le TFPI est également présent dans la plaquette. Ainsi, la mobilisation du TFPI pourrait participer à l'activité anticoagulante de l'HNF.

L'HNF a une demi-vie courte, de l'ordre d'une à deux heures, et elle est éliminée par des mécanismes cellulaires complexes, principalement au niveau hépatique et endothélial.

Les traitements par HNF se surveillent par la mesure d'un temps de céphaline + activateur (TCA). Des méthodes amidolytiques mesurant l'effet anti-Xa ou anti-IIa peuvent être utilisées. Des méthodes réalisables au lit du malade (*bedside*) de type *Activating Clotting Time* (ACT) sont également utilisés.

- **Modalités d'utilisation en hémodialyse**

Le but de l'anticoagulation en hémodialyse, est d'administrer la plus petite dose capable d'anticoaguler le circuit, tout en limitant le risque de saignement. Différentes modalités ont été proposées : administration d'un bolus intraveineux à dose fixe, suivi d'une dose d'entretien ou de la ré-administration d'un nouveau bolus (236). En dehors des études cliniques, l'anticoagulation du circuit est surveillée par inspection visuelle : caillottage du piège à bulle, élévation des pressions en amont du dialyseur. Certains essais ont évalué des tests *bedside* ou classiques, chronométriques (ACT, TCA = APTT) ou chromogéniques (anti-Xa). D'autres ont mesuré des marqueurs de génération de thrombine, comme le complexe thrombine-antithrombine (TAT), le fragment 1.2 de la prothrombine, le fibrinopeptide A et les D-Dimères. Enfin, certains marqueurs de l'activation endothéliale (TFPI, thrombomoduline soluble, facteur Willebrand) ou d'activation plaquettaire (TGFb1, F4P) ont été mesurés (237).

### **3.3.2 Héparines de bas poids moléculaires (HBPM)**

- **Rappels pharmacologiques**

Les HBPM sont obtenues par dépolymérisation chimique ou enzymatique, à partir d'une préparation d'HNF. Les HBPM ont la même structure que les HNF ; leur masse moléculaire est plus légère, variant de 2 à 12 kDa (233). En conséquence, leur effet anticoagulant est caractérisé par un rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa supérieur à 1 (ratio anti-Xa/anti-IIa = 1 pour l'HNF, par définition). Le TCA n'est pas utilisable pour surveiller biologiquement l'effet anticoagulant de ces molécules. Ainsi, la mesure de l'activité anti-Xa est la méthode de référence.

A la différence des HNF, l'élimination des HBPM est principalement rénale. Leur demi-vie est plus longue.

- **Modalités d'utilisation en hémodialyse**

Les HBPM sont administrées sous forme d'un bolus intraveineux unique, en début de dialyse. La posologie est généralement adaptée au poids du patient. Dans certains cas, des phases de « titration » sont réalisées afin de déterminer la dose optimale de façon individualisée. Comme avec l'HNF, la surveillance de l'anticoagulation pendant l'hémodialyse, se fait visuellement et en surveillant les pressions. Dans certaines situations

cliniques, des mesures d'activité anti-Xa ont été réalisées, soit par méthodes conventionnelles, amidolytiques (anti-Xa), soit par méthodes *bedside* (anti-Xa ACT, Sonoclot).

Lors de certains essais cliniques, il a été montré que l'élévation du TFPI était observée chez l'hémodialysé, de façon comparable que l'on ait administré une HBPM ou une HNF.

Les textes de recommandations proposent l'utilisation préférentielle des HBPM par rapport à l'HNF chez le patient hémodialysé : selon *l'European Best Practises Guidelines*, il s'agit d'une recommandation de grade élevé (A). Les arguments en sont : sécurité établie (grade A), efficacité équivalente (A), facilité d'utilisation (C). Parmi les autres avantages, sont cités : un effet favorable sur le profil lipidique des patients (B), un effet moindre sur la kaliémie (B), un potentiel hémorragique moindre (B).

L'ensemble des avantages des HBPM et des HNF sont résumés dans le [tableau 5](#).

	Héparine non fractionnée	Héparines de bas poids moléculaire
<b>Avantages</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- élimination extra-rénale</li> <li>- antidote disponible (protamine)</li> <li>- demi-vie courte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- maniabilité</li> <li>- amélioration du profil lipidique</li> <li>- meilleure maîtrise de la kaliémie</li> </ul>
<b>Inconvénients</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- inducteur de TIH</li> <li>- ostéoporose</li> <li>- anomalies du bilan lipidique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- élimination rénale</li> <li>- demi-vie longue (3 à 10h)</li> <li>- persistance du médicament entre les séances</li> <li>- absence d'antidote de l'activité anti-Xa</li> <li>- inducteur de TIH</li> </ul>

**Tableau 5: Avantages et inconvénients des HNF et des HBPM.**

### 3.3.3 Alternatives aux HNF et HBPM

#### *a- Fondaparinux*

- **Rappels pharmacologiques**

Le fondaparinux est un pentasaccharide obtenu par synthèse chimique. Sa structure est celle du motif pentasaccharidique des héparines. Sa masse moléculaire est de 1,7 kDa. Le fondaparinux se fixe à l'AT au niveau des résidus Arg46-Arg47-Lys114-Lys125-Arg129. Ce complexe inhibe le facteur Xa mais n'a pas d'effet sur la thrombine.

La demi-vie du fondaparinux est de l'ordre de 17 heures et l'élimination du médicament est quasi exclusivement rénale (238-240). Le fondaparinux se surveille par mesure d'activité anti-Xa, selon une calibration spécifique.

- **Modalités d'utilisation en hémodialyse**

Le fondaparinux a été utilisé en hémodialyse (241, 242) en cas de contre-indication aux HNF/HBPM. Lors d'un essai clinique, le fondaparinux s'est avéré efficace pour prévenir la coagulation du circuit, mais des saignements mineurs accrus ont été observés. Des mesures d'activité anti-Xa ont montré la persistance du fondaparinux entre 2 séances d'hémodialyse, mais pas d'accumulation du médicament (243, 244).

Ce médicament n'est pas recommandé dans l'EBCP 2012, y compris en cas de thrombopénie induite par l'héparine (TIH) et n'a pas d'autorisation dans l'indication de l'hémodialyse.

#### *b- Danaparoïde sodique*

- **Rappels pharmacologiques**

Le danaparoïde sodique est un héparinoïde de synthèse. Il s'agit d'un mélange de glycosaminoglycanes (héparane-, dermatane-, chondroïtine-sulfates) catalysant le facteur Xa de façon dépendante de l'AT. La molécule possède un ratio d'activité anti-Xa/anti-IIa de l'ordre de 20-25. La demi-vie de la molécule est de l'ordre de 25 heures (245). L'élimination du médicament est principalement rénale.

La surveillance biologique du médicament est possible par la mesure de l'activité anti-Xa (calibration spécifique).

Le danaparoïde sodique dispose d'une autorisation de mise sur le marché chez les patients présentant une TIH, y compris pour l'hémodialyse.

- **Modalités d'utilisation en hémodialyse**

Le danaparoïde sodique est administré en bolus unique, en début de séance, selon une posologie adaptée au poids et au taux résiduel mesuré en début de séance (240).

Le danaparoïde sodique est recommandé dans l'hémodialyse chez le patient atteint de TIH par l'EBPG 2012 (grade A) et par le *Kidney Disease Outcome Quality Initiative* 2005 K/DOQUI 2005 (grade 2B).



### *c- Inhibiteurs directs de la thrombine*

- **Rappels pharmacologiques**

Les inhibiteurs directs de la thrombine ont été utilisés en hémodialyse. Il s'agit de l'hirudine, de la lépirudine, de la bivalirudine et de l'argatroban.

- L'hirudine est un polypeptide de 65 acides aminés, inhibant directement le site catalytique de la thrombine. La lépirudine est une forme recombinante d'hirudine. Les hirudines ont une demi-vie de l'ordre de 60 minutes, et une élimination rénale. Ces molécules s'accumulent chez l'insuffisant rénal, avec des demi-vies pouvant atteindre plusieurs jours chez certains patients. Des anticorps dirigés contre la lépirudine ont été décrits.
- La bivalirudine est un polypeptide synthétique de 20 acides aminés, analogue de l'hirudine. Sa demi-vie est courte, de l'ordre de 25 minutes, et son excrétion rénale ne représente que 20 %.
- L'argatroban est une petite molécule, d'une masse moléculaire de 0,5 kDa, inhibant la thrombine. Sa demi-vie est courte, de l'ordre de 45 minutes. La molécule est métabolisée par le foie *via* les cytochromes P450 3A4/5.

Ces molécules se surveillent biologiquement par le TCA, le temps de thrombine, le temps d'écarine (ECT), ainsi que par différentes méthodes chromométriques ou chromogéniques mesurant une activité anti-IIa.

- **Modalités d'utilisation en hémodialyse**

L'hirudine a été le premier anticoagulant utilisé en Allemagne, dès 1924 (246). Les hirudines sont administrées en bolus en début de séance. Les posologies de lépirudine doivent être adaptées au type de dialyseur et au mode d'épuration choisi. En effet, la molécule est dialysable, et son élimination semble plus importante avec les membranes de polysulfone (247, 248).

La bivalirudine s'administre en bolus en début de séance, suivi d'une perfusion continue. Les ajustements de posologie sont effectués selon les résultats biologiques (TCA, ECT).

L'argatroban a été utilisé avec efficacité, en hémodialyse, avec différents schémas d'administration, en bolus ou en perfusion continue. Des ajustements de posologie peuvent être proposés, chez l'insuffisant hépatique.

Les hirudines et l'argatroban sont recommandées dans l'hémodialyse chez le patient atteint de TIH par l'EBPG 2012 (grade A) et par le K/DOQUI 2005 (grade 2B). Depuis la publication de ces textes de recommandations, la lépirudine n'est plus commercialisée (avril 2012).

#### *d- Citrate trisodique*

Le citrate trisodique, chélateur du calcium, peut être utilisé en hémodialyse, chez le patient à risque hémorragique élevé ou ayant présenté une TIH. Le calcium trisodique est associé (ou non) au dextrose et à l'acide citrique (ACD) (249). Les complexes citrate-calcium sont dialysables et éliminés en grande partie lors des séances. L'utilisation de citrate trisodique impose la surveillance biologique de la calcémie et de la magnésémie ainsi que la supplémentation calcique afin d'éviter l'hypocalcémie aiguë.

Cette technique est recommandée chez les patients présentant une contre-indication aux anticoagulants par l'EBGB 2002 (grade A) et par la *British Renal Association clinical practice guidelines* UK guidelines 2007 (grade 1C).

#### *e- La prostacycline et les prostanoides*

La prostacycline (PGI<sub>2</sub>) est un antihrombotique naturel produit par l'endothélium, à partir de l'acide arachidonique. La PGI<sub>2</sub> et son analogue epoprostenol, inhibent les fonctions plaquettaires en bloquant l'AMPC. D'autres prostanoides, tels que PGE<sub>1</sub> (ou alprostadil), PGE<sub>2</sub> et PGD sont utilisables en circulation extracorporelle. Ces molécules sont vasodilatatrices et entraînent des hypotensions artérielles. Elles ne peuvent pas être surveillées biologiquement par des analyses simples.

L'administration en perfusion de prostacycline est citée pour l'hémodialyse des patients à haut risque hémorragique par l'EBPG 2002 (grade A) et par l'UK guidelines 2007 (grade 1C).

## **4. HEMOCOMPATIBILITE DES MEMBRANES D'HEMODIALYSE**

La biocompatibilité est définie comme étant "la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée, dans une application spécifique" (Eur Soc for Biomaterials, 1986). L'hémocompatibilité fait référence à la thrombogénicité et la réponse inflammatoire induite par les matériaux. Lors du contact du sang avec les biomatériaux, les leucocytes s'activent, par différentes voies, notamment par l'intermédiaire de l'activation du complément et la libération d'anaphylatoxines C5a et C3a (250). Les leucocytes activés sur-expriment les intégrines, ce qui augmente leur capacité d'adhésion ; ils forment des agrégats hétérotypiques avec les plaquettes, par des interactions de type P-sélectine/P-sélectine ligand (PSGL) (251).

Les leucocytes relarguent des médiateurs tels que le *Platelet activating factor* (PAF) mais également des enzymes protéolytiques comme l'élastase. Cette libération d'élastase perturbe les systèmes régulateurs de la coagulation, notamment en dégradant le TFPI, puissant inhibiteur du complexe FT-VIIa et du facteur Xa.

Les plaquettes expriment le récepteur C1q du complément, lequel est impliqué dans l'activation de la  $\beta 3$  intégrine GPIIb/IIIa, l'expression de P-sélectine et l'activité procoagulante (252). Les plaquettes activées libèrent également de nombreux médiateurs, tels que la chémokine F4P (facteur 4 plaquettaire). Cette chémokine possède la propriété de neutraliser l'héparine ; par ailleurs, les complexes héparine-F4P expriment des épitopes immunogènes, à l'origine de thrombopénies induites par l'héparine (TIH). Les leucocytes et les plaquettes activés expriment la phosphatidylsérine et émettent des microparticules procoagulantes.

L'équipe d'Ansgar a proposé un score d'évaluation de l'hémocompatibilité (253). Ce score a été établi à partir d'une série standardisée de tests *in vitro*. Ces tests évaluent le système du complément et son activation (C5a), la coagulation (mesure des complexes thrombine-antithrombine), l'activation plaquettaire (numération plaquettaire et mesure de F4P plasmatique), l'activation des polynucléaires neutrophiles (mesure de l'élastase).

L'adsorption sélective de protéines plasmatiques est un paramètre essentiel dans l'évaluation de l'hémocompatibilité des matériaux biomédicaux (254). En effet, l'adsorption du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), induit l'activation de la phase contact. Les membranes telles que l'AN69®, composée de polyacrylonitrile, ont une surface chargée électronégativement. Cette propriété physique joue un rôle crucial dans le processus de coagulation. Il a été démontré que la réduction de l'électronégativité de surface de l'AN69® par fixation d'un polymère polycationique de polyéthylèneimine (PEI) modifiait les profils d'adsorption spécifiques des protéines plasmatiques, avec une forte diminution de la fixation de KHPM et de facteur XII. En revanche, l'héparine polyanionique se fixe sur cette membrane modifiée. Des études réalisées *in vitro* et *ex vivo* ont démontré que le traitement des membranes avec le PEI favorise l'hémocompatibilité (254-256).

Une nouvelle membrane capable de fixer l'héparine à sa surface, appelée EVODIAL® a été mise sur le marché. C'est une membrane AN69ST® (257-259), sur laquelle se fixe l'héparine. Cela permet de réduire les doses d'héparine (non fractionnées) administrées au patient. Il a été montré que les doses d'héparine requises pour prévenir la coagulation sont réduites d'au moins 50% (259, 260).

L'activation de la coagulation a donc été interprétée comme secondaire à celle du système contact. Néanmoins, une étude récente met en avant le rôle possible de la voie extrinsèque et du FT associé aux leucocytes. Dans cette étude, les auteurs ont montré que les alkykthiols assemblés en monocouches, et parfaitement caractérisés selon des paramètres physico-chimiques, étaient capables d'induire une expression de FT par des leucocytes, obtenus à partir de sang héparinisé (261).

Parmi les facteurs déterminants de l'hémocompatibilité, il est important de mettre en avant le rôle du flux. En effet, dans le circuit d'hémodialyse, les conditions de flux sont extrêmement variées, ce qui a un impact dans les phénomènes d'adhésion et d'activation plaquettaires, et en premier lieu, celles qui dépendent du facteur Willebrand. Les conditions de flux sont elle-même très dépendantes de l'hématocrite du sujet, le sang total se comportant comme un fluide non newtonien.

Enfin, les endotoxines (ou « LPS ») sont de puissants activateurs des fonctions leucocytaires et de l'expression de FT. Avec la mise en place de contraintes réglementaires, l'effet de ces endotoxines dans la thrombogénicité ou l'hémocompatibilité des systèmes d'hémodialyse devraient être négligeable voire inexistant.

# TRAVAUX PERSONNELS

### III. TRAVAUX PERSONNELS

#### 1. OBJECTIFS

Le déclenchement de la coagulation dans le circuit de dialyse reste à élucider. L'hémodialyseur constitue plus de 90 % (soit 2,2 m<sup>2</sup>) de la surface totale de circuit de dialyse. La thrombose induite par l'hémodialyseur est généralement attribuée à la coagulation du sang initiée par la phase de contact. Cette implication de la phase contact est bien documentée. L'utilisation actuelle de matériaux moins électro-négatifs diminue considérablement la capacité des membranes à activer le facteur XII de la coagulation. En revanche, le rôle du FT et des cellules qui l'expriment n'a jamais été étudié. Les données disponibles se rapportent, pour la majorité, à des modèles *in vitro* réalisés après incubation du sang en contact des matériaux ou *ex vivo*, utilisant des modèles de mini-dialyseur.

Compte tenu de l'importance de l'initiation extrinsèque de la coagulation du sang *in vivo*, nous avons émis l'hypothèse que des cellules du sang périphérique, activées au cours de l'hémodialyse, pouvaient adhérer à la membrane du dialyseur et exprimer le FT, induisant l'initiation de la coagulation dans le dialyseur. Il s'agit d'un nouveau concept de la coagulation en hémodialyse.

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude des cellules ayant été en contact avec les membranes de dialyse : caractérisation de ces cellules ; niveau d'activation de ces cellules, niveau d'expression du FT.

Dans cette première étape nous ayant montré un rôle majeur du FT véhiculé par les PNN, nous avons cherché à mettre en évidence une expression de FT par des PNN provenant de péritonites. Par ailleurs, nous avons étudié des PNN provenant de témoins sains, que nous avons stimulés par des cytokines pro-inflammatoires : l'IL8 et le TNF- $\alpha$ . Nous avons étudié les mécanismes intracellulaires impliqués dans la régulation de l'expression de FT dans les PNN.

Après avoir mis en évidence l'expression du FT par les PNN, ainsi que la présence de ces cellules au niveau de la membrane d'hémodialyse, nous avons apporté la preuve du concept du rôle du FT dans la coagulation de l'hémodialyse, en inhibant le FT par un FVIIa inactivé dans un modèle animal, chez la brebis.

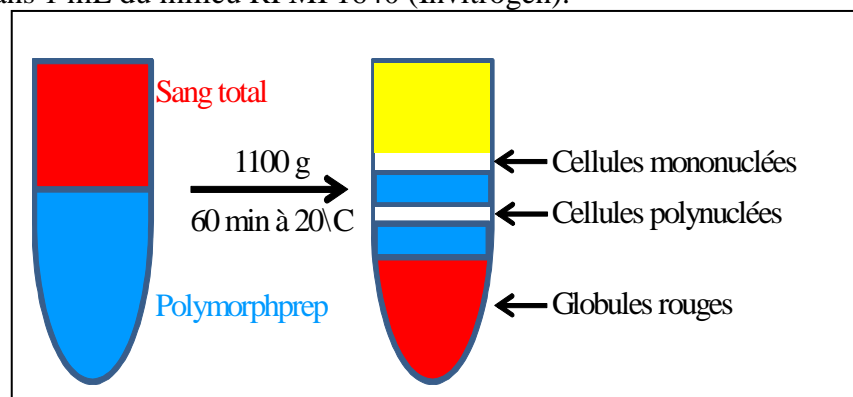
## 2. MATERIELS ET METHODES

### 2.1 ISOLEMENT DES PNN DES SUJETS SAINS

L'isolement des polynucléaires s'effectue à partir de sang total veineux anti-coagulé par l'EDTA chez des sujets sains n'ayant pas pris de traitement médicamenteux. La séparation des cellules polynucléées et mononucléées du sang périphérique, a été réalisée par centrifugation en gradient de densité en utilisant le réactif Polymorphprep™ (Abcys, France), dont les propriétés physico-chimiques permettent la séparation des cellules sanguines en fonction de leur taille.

Afin de séparer les deux populations cellulaires, 20 mL de sang total non dilué ont été déposés délicatement sur 20 mL de Polymorphprep™. Ces deux phases sont centrifugées à 1100 g pendant 60 min à température ambiante. Cette étape permet l'obtention de deux anneaux distincts. L'anneau supérieur contient les cellules mononucléées et l'anneau inférieur contient les PNN (Figure 15).

Les PNN sont ensuite lavés deux fois dans un tampon HBSS (centrifugation de 10 min à 350g). Entre ces deux lavages, une lyse des globules rouges contaminant la suspension cellulaire est réalisée par Versalyse™ (Immunoteck, Beckman Coulter). Les PNN sont ensuite mis en suspension dans 1 mL du milieu RPMI 1640 (Invitrogen).



**Figure 15 : Principe de l'isolement des PNN sur Polymorphprep™**

Avant toute manipulation, chaque isolat est compté sur un automate hématimètre (ADVIA 2120®, Siemens), afin d'ajuster la concentration des PNN et d'évaluer la contamination résiduelle plaquettaire. Sur certains isolats, un étalement sur lame par Cytospin3®, une coloration au MGG et un comptage des plaquettes résiduelles en cytométrie en flux (CMF) ont été réalisés.

### **2.1.1 Etude de la viabilité par un marquage au 7-AAD**

Ce marquage repose sur la capacité du 7 Amino-Actinomycine D (7-AAD) à s'intercaler entre les bases cytosine et guanine de l'ADN double brin. Les PNN présentant un marquage par le 7-AAD sont non viables.

Le marquage de l'ADN est réalisé en incubant les échantillons avec le réactif 7-AAD pendant 10 min, à température ambiante, les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux, afin de déterminer le pourcentage de cellules viables.

### **2.1.2 Analyse de la pureté et du pourcentage de PNN**

#### **2.1.2.1 Principe de la technique de cytométrie en flux**

La cytométrie en flux est une technique de mesure des cellules en suspension en phase liquide. Les cellules sont entraînées par un liquide de gaine devant une source laser. Cette technique permet d'identifier différentes populations de cellules grâce à la mise en évidence d'antigènes de surface par des anticorps couplés à des fluorochromes.

- Exposées à la source lumineuse, elles émettent un signal de diffraction laser qui permet de discriminer différents types cellulaires en fonction de paramètres de taille et de structure.
- Elles émettent un signal de fluorescence grâce à des anticorps couplés à des fluorochromes dans le cas de l'immunophénotypage.

#### **2.1.2.2 Marquage des PNN et analyse de la pureté**

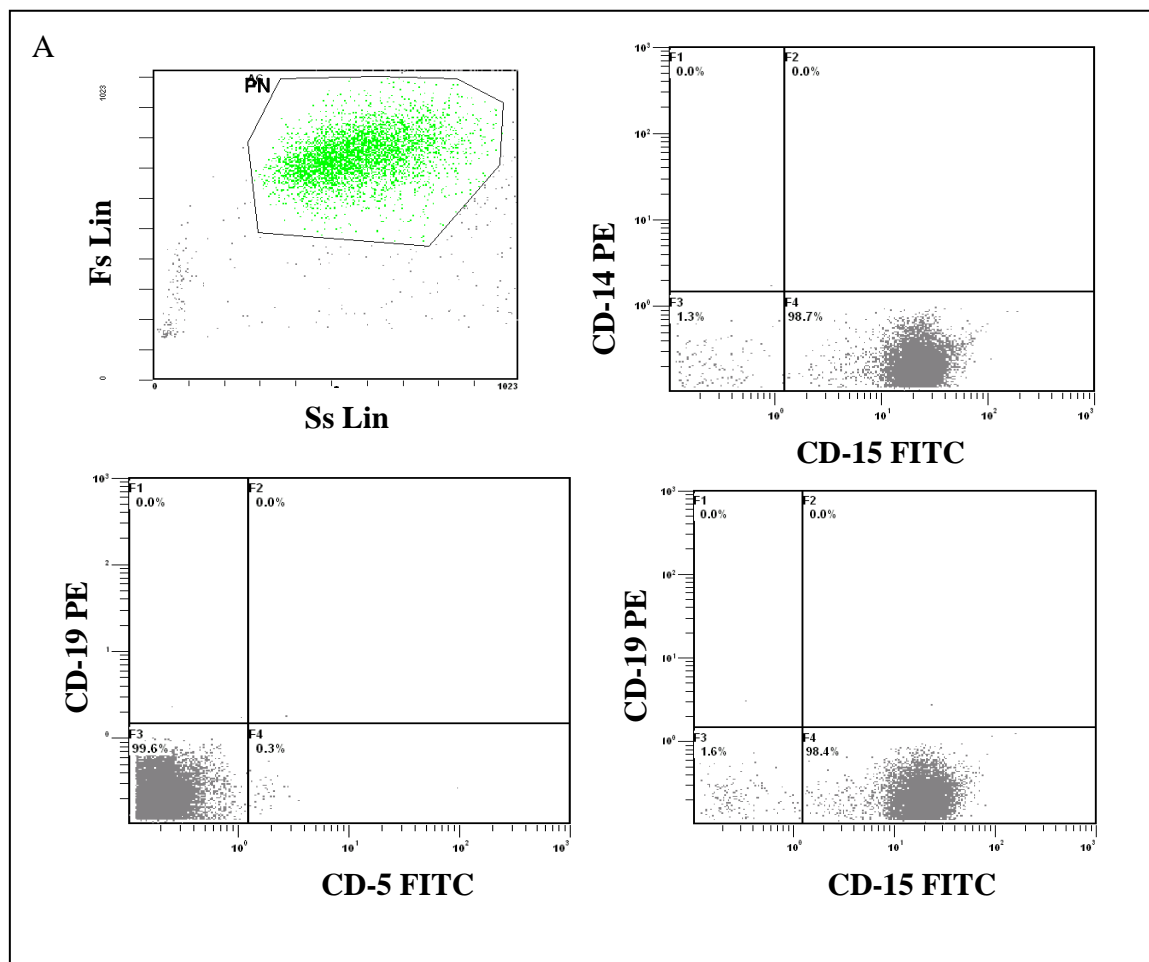
Afin de nous assurer de la pureté des PNN isolés par gradient de densité, nous avons analysé par cytométrie en flux la présence relative des lymphocytes T, des lymphocytes B et des monocytes dans nos échantillons. Pour cela, nous avons effectué des marquages permettant d'identifier les marqueurs de surface CD5 (marqueur spécifique des lymphocytes T), CD14 (marqueur des monocytes), CD19 (marqueur des lymphocytes B) et CD15 (marqueur des neutrophiles). Pour réaliser ces marquages membranaires, 100 µL d'une suspension cellulaire à  $5.10^6$  cellules/mL ont été incubées avec les anticorps monoclonaux fluorescents suivants :

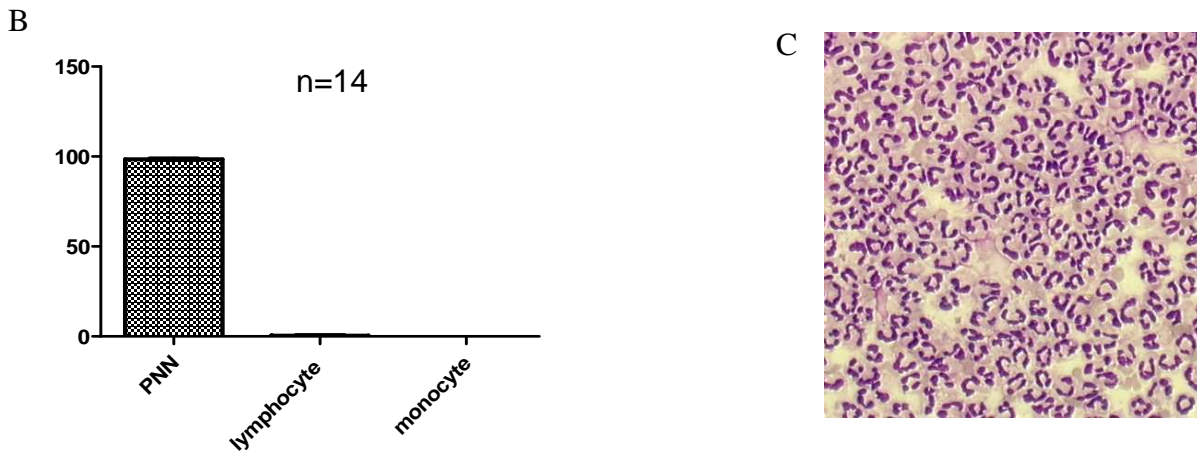
- Anti-CD5 couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (*monoclonal mouse anti-human clone UCHL1*, Dako)
- Anti-CD14 couplé à la phycoérythrine (PE) (*monoclonal mouse anti human clone TUK4* Dako)



- Anti-CD19 couplé PE (*monoclonal mouse anti human clone J3-119*, immunotech)
- Anti-CD15 couplé FITC (*monoclonal mouse anti-human clone C3D-1*, Dako)

Après une incubation de 20 min à 4°C et à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées avec du PBS 1X par centrifugation pendant 10 min à 400 g. Le culot cellulaire est mis en suspension dans 500 µL de PBS avant l'analyse par cytométrie en flux. L'analyse réalisée sur l'ensemble de la population isolée par la technique du polymorphprep<sup>TM</sup> montre des pourcentages de PNN, de lymphocytes et de monocytes respectivement de 98,4% ± 0,83 ; 0,46% ± 0,23 et 0,03% ± 0,04 (Figure 16).





**Figure 16 : Analyse de la pureté des PNN: analyse en cytométrie en flux (A), et distribution des pourcentages (%) (B). analyse en microscopie optique (coloration MGG) (C).**

### **2.1.3 Traitement des PNN purifiés à partir de témoins sains**

#### **2.1.3.1 Stimulation par TNF ou IL-8+TNF**

Les PNN sont directement stimulés en RPMI 1640 avec le TNF à 100 ng/mL ou pré-incubé avec l'IL-8 (500ng/mL) puis le TNF (Figure 17). Au terme de la stimulation, les cellules sont rincées avec du PBS puis mises en suspension en Trizol® pour l'analyse des ARNm ou dans un tampon de lyse (RIPA) pour l'analyse protéique.

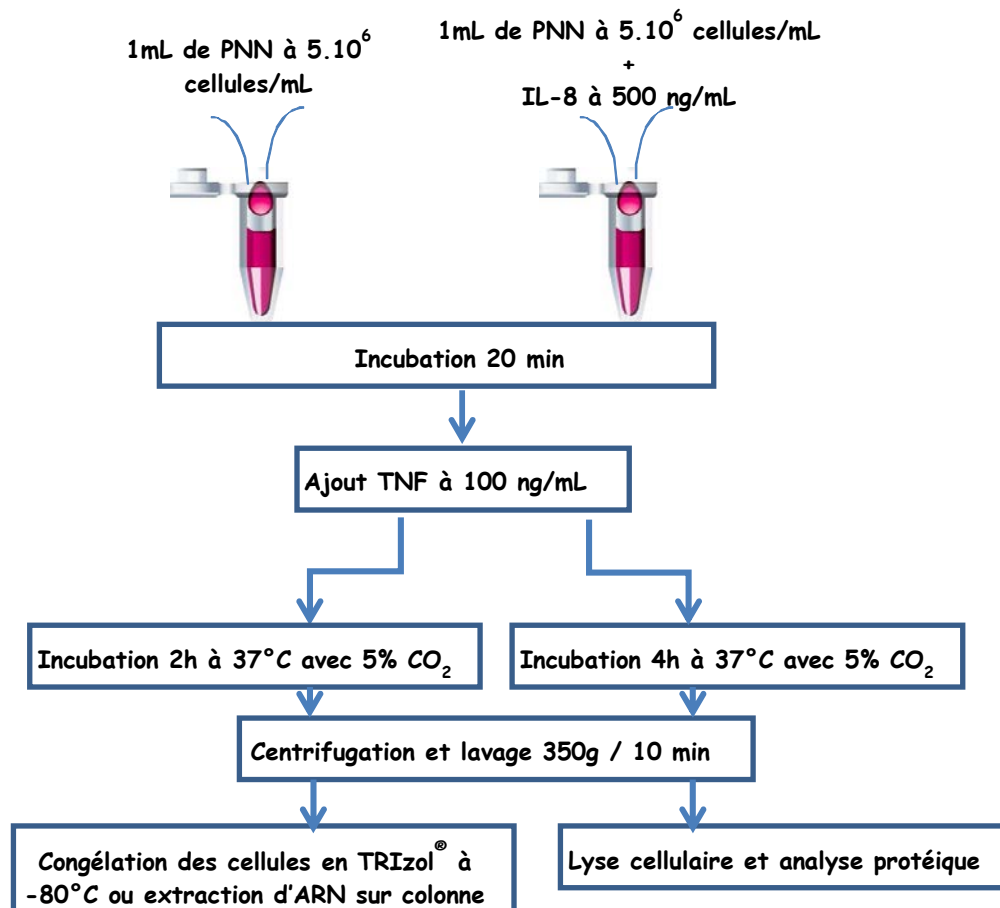


Figure 17 : Protocole de stimulation des PNN par TNF ou IL-8+TNF

### 2.1.3.2 Inhibiteurs chimiques

#### *a- U0126 inhibition de la voie ERK1/2*

L'U0126 inhibe la phosphorylation de MEK1 et de MEK2, avec une plus forte affinité pour MEK1 (IC<sub>50</sub> de 72 nM) que pour MEK2 (IC<sub>50</sub> de 58 nM). Cet inhibiteur entre en compétition avec le site de liaison à l'ATP de ces kinases et les inhibe de manière allostérique. Les PNN sont incubés pendant 30 min à température ambiante avec 10 µM de U0126 avant d'ajouter le TNF à 100 ng/mL (Figure 18).

La structure chimique de l'U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio) butadiène) est représentée sur la Figure 19.

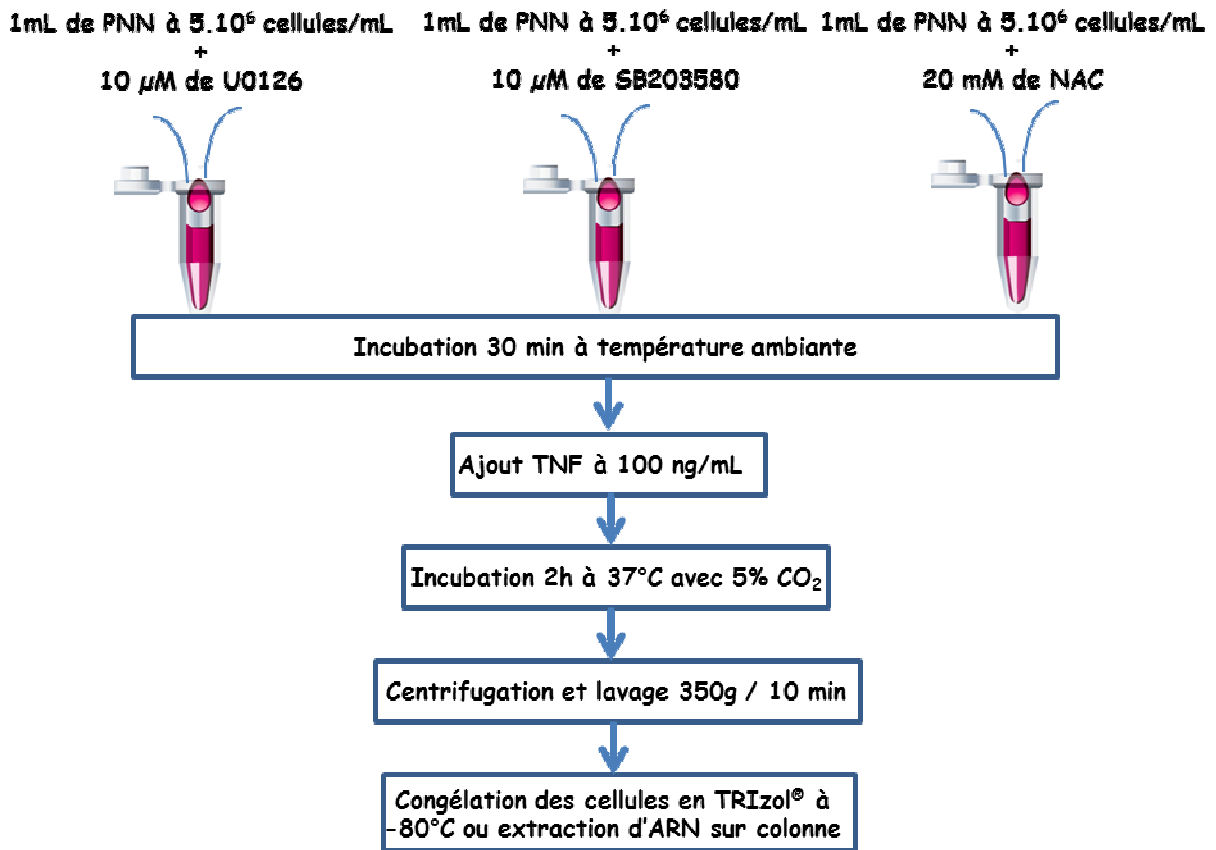


Figure 18 : Protocole de traitement des PNN par les inhibiteurs chimiques : U0126, SB203580, NAC.

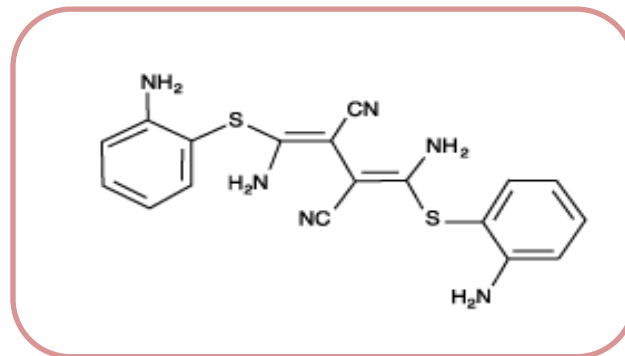


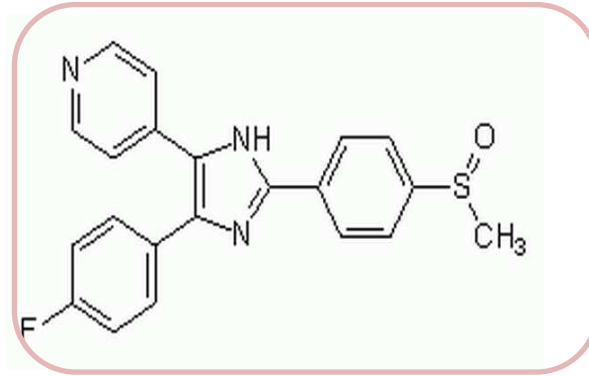
Figure 19 : Structure chimique de l'U0126

#### *b- SB203580*

C'est un inhibiteur spécifique de p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  (262). Il inhibe de façon compétitive la liaison de l'ATP à son site. Il n'inhibe pas les autres isoformes de p38. L'IC50 du SB203580 est d'environ 50 nM pour la p38 $\alpha$  et 500 nM pour la p38 $\beta$ . Les PNN sont incubés pendant 30

min à température ambiante avec 10  $\mu\text{M}$  du SB203580 avant d'ajouter le TNF à la concentration de 100 ng/mL (Figure 18).

La structure chimique du SB203580 (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl) 1H-imidazole) est représentée sur la Figure 20.

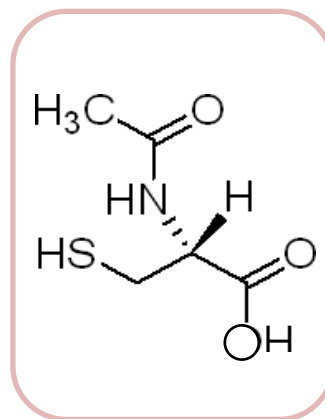


**Figure 20 : Structure chimique du SB203580**

#### *c- NAC (N-Acétyl-L-Cystéine)*

Le NAC est un puissant antioxydant, qui agit comme "piégeur" de radicaux libres, en neutralisant directement le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou l'acide hypochloreux. Les PNN sont incubés pendant 30 min à température ambiante avec 20 mM de NAC avant d'ajouter le TNF à 100 ng/mL (Figure 18).

La structure chimique du NAC (N-Acétyl-L-Cystéine) est représentée sur la Figure 21.



**Figure 21 : Structure chimique du NAC**

### 2.1.3.3 Effet de l'adhésion

#### a- Manganèse ( $Mn^{2+}$ )

Le manganèse est un cation divalent qui se lie sur la portion extracellulaire de l'intégrine (MIDAS (*Metal Ion Dependent Adhesion Site*)). Le  $Mn^{2+}$  permet l'activation de l'intégrine et la modification de sa conformation vers un état de "haute affinité". Les PNN sont incubés 2 h à 37 °C avec 1 mM de  $Mn^{2+}$  (Figure 22).

#### b- Anticorps bloquants anti- $\beta 2$ intégrine

L'anticorps anti- $\beta 2$  intégrine (clone IB4) bloque la sous unité CD18 du complexe hétérodimère CD18/CD11, récepteur spécifique de l'adhésion à la surface cellulaire. Les PNN sont incubés pendant 30 min à température ambiante avec 10  $\mu g/mL$  d'IB4 ou IgG2a avant d'ajouter le TNF à 100 ng/mL (Figure 22).

Pour toutes les expériences, un témoin sans traitement a été réalisé dans les mêmes conditions.

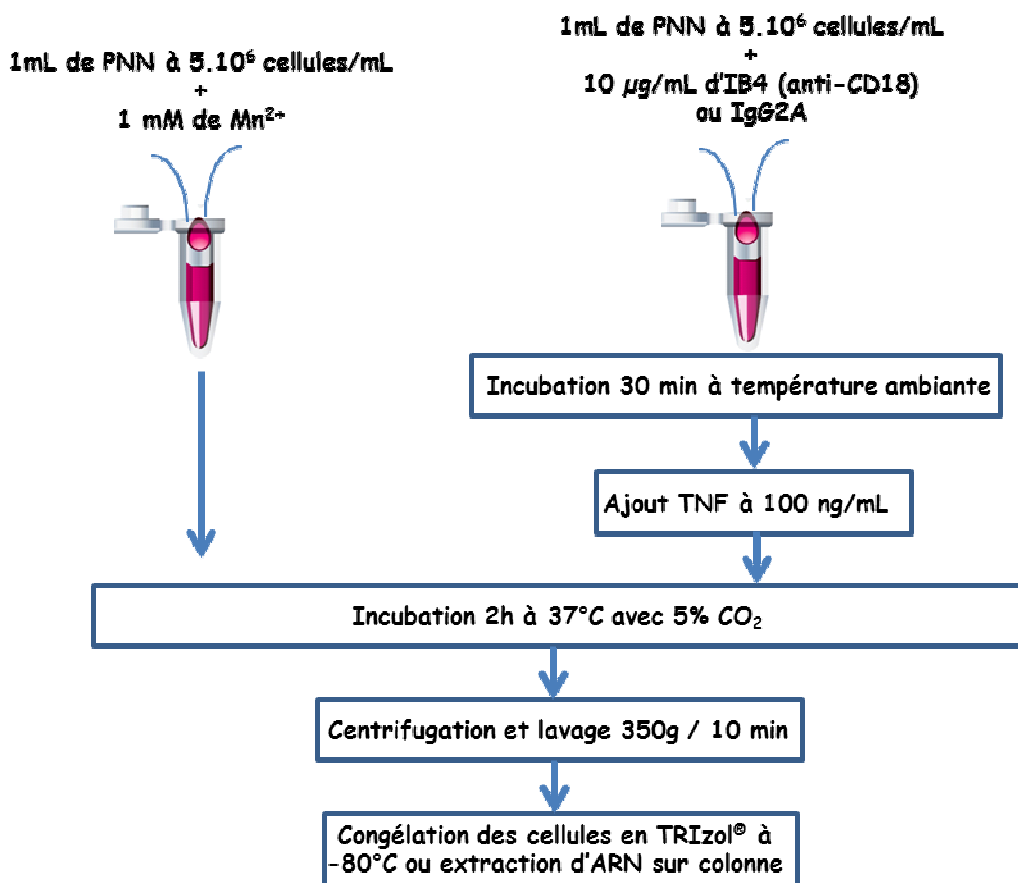


Figure 22 : Protocole de traitement de PNN par le manganèse ( $Mn^{2+}$ ), et par l'anticorps IB4 (anti-CD18) ou IgG2A control

## 2.2 ISOLEMENT DES PNN DU LIQUIDE PÉRITONÉAL

### *a- Observation macroscopique*

L'observation du liquide de drainage recueilli dans la poche de dialyse péritonéale a un aspect trouble et jaunâtre dans lequel on observe de la fibrine.

### *b- Etude cytologique*

Le nombre de leucocytes varie de 8000 à 20 000 cellules/mm<sup>3</sup>, avec une moyenne de 93% ± 2% de PNN et de 6% ± 2,2% de cellules mononuclées.

### *c- Analyse bactériologique*

La flore bactérienne retrouvée dans le liquide péritonéal est composée de bactéries à Gram positif (Entérocoques, Streptocoques et Staphylocoques) et à Gram négatif (E. coli). Une fois le diagnostic de péritonite confirmé, on récupère la poche afin de purifier les PNN présents dans le liquide.

### **2.2.1 Purification des PNN péritonéale par une technique de tri par billes magnétiques**

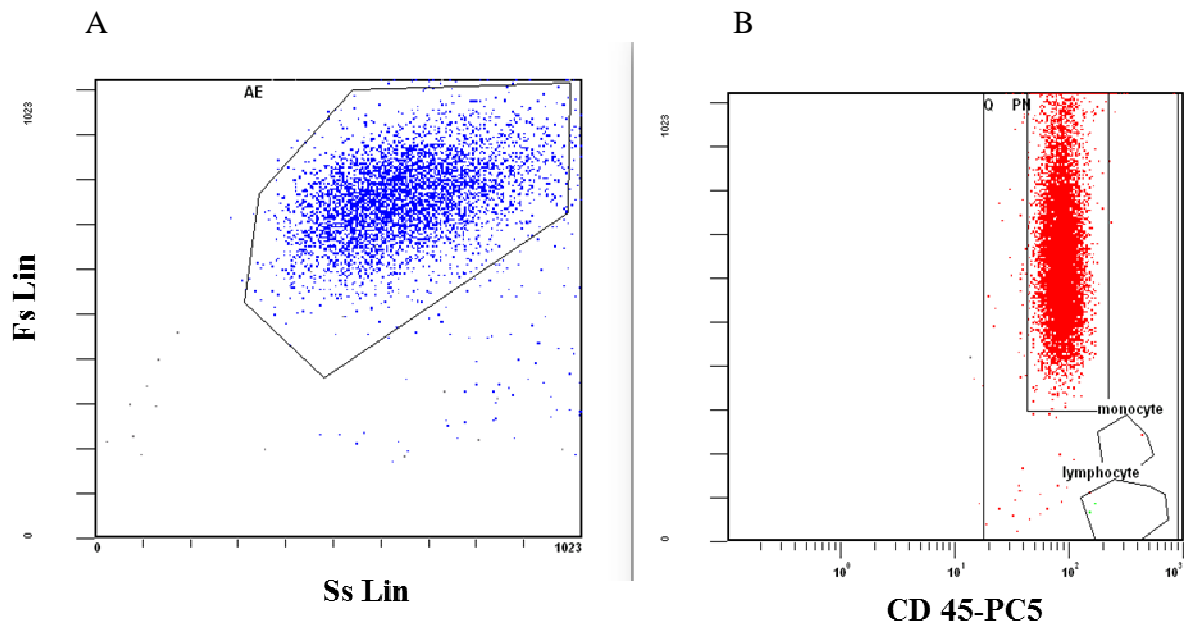
Les cellules de la poche péritonéale sont soumises à un tri par billes magnétiques afin de purifier les PNN. 10<sup>9</sup> cellules sont prélevées, lavées en PBS 1X puis centrifugées à 300 g pendant 10 min. Les cellules sont ensuite incubées pendant 15 min à 4°C en présence de 200 µL de billes magnétiques CD14+ (Miltenyi Biotec). Les cellules sont ensuite lavées avec 2 mL de tampon PBS filtré, puis centrifugées à 300 g pendant 10 min. Le culot cellulaire est mis en suspension en PBS (500 µL).

La sélection par les billes magnétiques se fait grâce à un aimant (MiniMACS™ Separator, Miltenyi Biotec) qui est fixé sur un portoir spécifique (MACS® MultiStand, Miltenyi Biotec). Les colonnes (MS Columns, Miltenyi Biotec) se fixent à l'aimant, puis sont réhydratées par 500 µL de tampon PBS filtré.

La suspension cellulaire est versée dans la colonne. Une fois l'ensemble de la suspension cellulaire éluée de la colonne, on lave 3 fois avec 500 µL de tampon PBS. L'éluat contient les cellules CD14 négatives, qui sont ensuite lavées 2 fois en PBS.

Afin d'analyser la pureté des PNN obtenus après tri magnétique, les cellules d'intérêt sont marquées avec un anticorps monoclonal anti-CD45 humain couplé à la phycocyanine 5 (PC5) et analysées par cytométrie en flux. Les cellules sont incubées pendant 20 min à l'abri de la

lumière puis lavées 2 fois avec du PBS par centrifugation à 350 g pendant 10 min. Le culot cellulaire est mis en suspension dans 500  $\mu$ L de PBS avant l'analyse par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 23**. Les cellules triées, CD45 positives présentent 99% de PNN.



**Figure 23 : Analyse par cytométrie en flux des cellules, après tri magnétique: A : taille/structure ; B : marquage CD45-PC5**

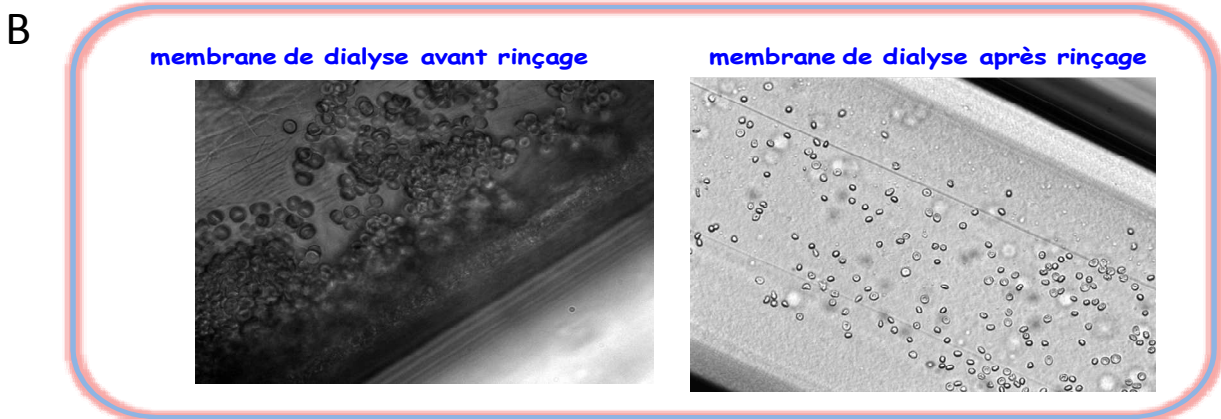
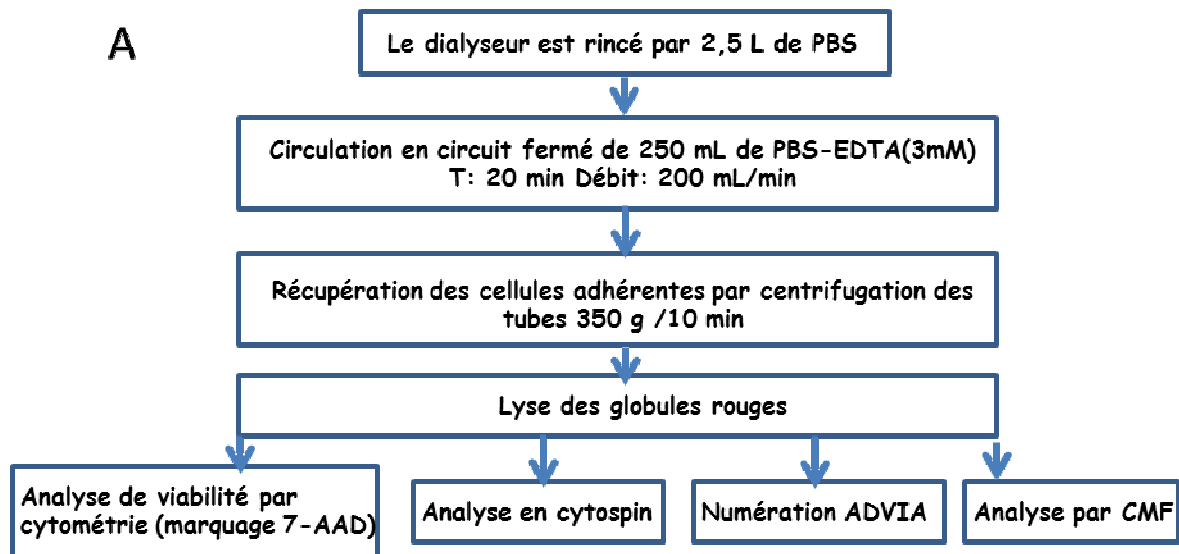
### 2.3 RECUEIL DES CELLULES ADHERENTES A LA MEMBRANE DE DIALYSE

Le protocole d'élution a été adapté des procédures décrites antérieurement par Grooteman (263, 264). Une fois la séance de dialyse terminée, la procédure d'élution est débutée. Le générateur d'hémodialyse (INTEGRA<sup>®</sup> - GAMBRO) est en mode restitution, sans circulation du dialysat dans l'hémodialyseur.

Dans un premier temps, le circuit de dialyse (lignes et dialyseur) est rincé à l'aide d'une poche de 2,5 L de solution PBS, connectée à la ligne artérielle du circuit, à la vitesse de 200 mL/min. Des études préliminaires ont permis de définir le volume de 2,5 L de rinçage comme étant celui qui permet l'absence de cellules dans l'éluat (données non présentées). Le circuit est ensuite rempli de 250 mL de solution de PBS contenant 3 mM d'EDTA tétrasodique. Cette solution sera mise en circulation (circuit fermé) pendant 20 min au débit de 250 mL/min sur le générateur d'hémodialyse. Les 250 mL de solution sont ensuite récupérés en sortie de ligne



veineuse dans des tubes polypropylène de 50 ml (Becton Dickinson). Les suspensions cellulaires sont centrifugées pendant 10 min à 350 g. Les surnageants sont jetés et les culots sont mélangés dans un tube polypropylène de 15 ml (Becton Dickinson), puis le volume est ajusté à 10 mL dans le PBS. On réalise deux lavages cellulaires. Entre les deux lavages, une lyse des globules rouges est réalisée, puis le culot est mis en suspension dans du PBS-BSA 0,1% à la concentration de  $5 \cdot 10^6$  globule blancs/mL pour le phénotypage (Figure 24).



**Figure 24 : A: Protocole d'éluion du dialyseur. B: Observation microscopique des fibres de membrane de dialyseur avant et après rinçage par PBS.**

## **2.3.1 Analyse des cellules adhérentes**

### **2.3.1.1 Phénotypage des PNN**

Le phénotypage des PNN est réalisé sur sang total pour les cellules circulantes, et sur l'éluât de l'hémodialyseur pour les cellules adhérentes. On met en présence 100 µL de sang ou d'éluât, avec 20 µL d'Anticorps (AC) pendant 30 min à 4°C, à l'obscurité. Les AC utilisés sont dirigés contre des molécules membranaires du PNN, à savoir CD11b (clone Bear1 - Beckman Coulter), CD66b (clone 80H3 - Beckman Coulter) et CD63 (clone CLBGran/12 - Beckman Coulter). Un marquage par le CD62P (clone CLBThromb/6 - Beckman Coulter) de la population neutrophile et un co-marquage le CD45 (clone J.33 - Beckman Coulter) et P-selectine (clone P2 - Beckman Coulter) des cellules adhérentes sont réalisés afin d'identifier la présence d'hétéro-agrégats leucoplaquettaires. Les tubes témoins sont réalisés sur des cellules en présence d'IgG isotypique contrôle (clone 679.1Mc7 - Beckman Coulter). Tous les AC sont conjugués au FITC, sauf le CD41, conjugué à la PE.

Les cellules sont ensuite lavées. L'étude en cytométrie en flux permet d'analyser l'intensité de fluorescence des cellules après détermination de la population d'intérêt par la taille et le marquage CD45.

## **2.4 TECHNIQUES UTILISEES**

### **2.4.1 RT-PCR**

#### **2.4.1.1 Extraction des ARN**

Les cellules incubées pendant 2 heures, en présence ou non de l'effecteur, sont rincées avec une solution de PBS puis mis en suspension par 1 mL de Trizol®. Après homogénéisation du mélange cellules-Trizol®, 200 µL de chloroforme sont ajoutés. La suspension cellulaire est agitée énergiquement, puis incubée durant 5 min à température ambiante avant d'être centrifugée à 12000 g pendant 20 min à 4°C. Cette étape permet la séparation des acides nucléiques par solubilisation différentielle. La phase aqueuse, contenant les ARN, est prélevée et précipitée par 500 µL d'isopropanol, pendant 15 min à température ambiante. Le mélange est déposé sur une colonne Rneasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) et centrifugé pendant 25 secondes à 13000 g. La colonne est lavée avec 350 µL de tampon RW1, l'élimination de l'ADN résiduelle se fait par traitement à la désoxyribonucléase I (DNase I), qui digère les ADN simple-brin et double-brin (oligodésoxyribonucléotide contenant une extrémité 5'-phosphate). Après 15 min de digestion à température ambiante la

colonne est lavée une fois avec 350 µL de tampon RW1 puis deux fois avec 500 µL de tampon RPE par des centrifugations successives de 25 secondes à 13000 g. Pour l'élution de l'ARN, on dépose 30 µL d'eau (*Rnase-free water*) directement sur la membrane de la colonne et on centrifuge 2 min à 13000g après 2 min d'incubation à température ambiante. L'échantillon d'ARN est dosé par spectrométrie et conservé à -80°C jusqu'à l'étape de transcription inverse.

#### **2.4.1.2 RT-PCR quantitative**

##### ***a- Principe***

La RT-PCR se fait en 2 étapes : une étape de transcription inverse (RT) qui permet de synthétiser les ADNc à partir des ARNm, et une étape d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'une sonde et de 2 amorces spécifiques encadrant la séquence à amplifier de l'ADNc . Cette technique permet d'étudier le niveau d'expression des gènes.

##### ***b- Synthèse du brin d'ADN complémentaire (Reverse transcriptase)***

La synthèse des brins d'ADNc est réalisée grâce au kit IScript (BioRad), à partir d'une solution de 1 µg d'ARN total extrait. Dans un tube stérile de 0,2 mL, on ajoute successivement:

- 1 µL d'IScript *reverse transcriptase (transcriptase inverse du virus de leucémie murine de Moloney (MMLV-RT))* pré-mélangé avec un inhibiteur de RNase.
- 4 µL d'IScript reaction Mix qui contient un mélange d'oligo (dT) et *random hexamers* correspondant à toutes les séquences possibles.
- 1 µg d'ARN dans 15 µL d'eau.

Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur pour des incubations de 5 min à 25°C, puis 30 min à 42°C et 5 min à 85 °C.

##### ***c- PCR quantitative***

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps « en temps réel » le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles, moins il faudra de nombre de

cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct (*cycle threshold* – cycle seuil) et apparaît en début de phase exponentielle.

Les PCR quantitatives sont réalisées grâce à un appareil Applied 7500 Fast Real-Time PCR System. Les PCR sont effectuées dans un volume total de 20 µL en utilisant 5 µL du milieu de transcription inverse contenant les ADNc à amplifier (dilué au 2/5), 10 µL de Applied Biosystems® TaqMan® Universal PCR Master Mix, 1 µL d'un mélange sonde et amorces, sens et anti-sens, du gène cible et 4 µL d'eau stérile traitée au DEPC. Le mélange subit les incubations suivantes : étape 1 : incubation 20 s à 50°C puis 10 min à 95°C, étape 2 : 15 s à 95°C puis 1 min à 60°C. Cette 2<sup>ème</sup> étape est renouvelée 40 fois.

Le gène d'intérêt est le facteur tissulaire. Parallèlement, on amplifie un gène de contrôle, d'expression constante, la  $\beta$ 2 microglobuline ; ceci permet d'éliminer les fluctuations liées à la quantité totale d'ARN dans les tubes. Les sondes et amorces Taqman® utilisées sont les suivants (Tableau 6) :

Référence Kit	Gène cible	Marque
Hs 00175225_m1	Facteur tissulaire	Applied Biosystems®
Hs 00187842_m1	$\beta$ 2 microglobuline	Applied Biosystems®

**Tableau 6 : Sondes et amorces Taqman® utilisées pour la PCR quantitative.**

## 2.4.2 Analyse protéique

### 2.4.2.1 Extraction des protéines

Les cellules sont rincées avec une solution de PBS puis lysées avec 200 µL de tampon RIPA (Tris HCl pH 7,5 à 20 mM, NaCl 137mM, Glycérol 10%, Triton  $\times$ 100 à 1%, 5 mM EDTA, 30 µg/mL aprotinin, 2 mM PMSF). Après une incubation de 30 min à 4°C, et en homogénéisant toutes les 5 min, une centrifugation est réalisée à 12000g pendant 10 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines est ensuite transféré dans un tube.

#### 2.4.2.2 Dosage protéique et préparation des échantillons

Les échantillons ainsi obtenus sont soumis à un dosage de protéines selon la technique de Bradford (265). Cette méthode est un dosage colorimétrique, basé sur l'absorbance à 595 nm. La liaison du réactif aux acides aminés aromatiques et aux résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines induit un changement de couleur (du rouge au bleu). Cinq  $\mu\text{L}$  d'échantillon à doser sont dilués dans 795  $\mu\text{L}$  d'eau distillée, auquel en ajoute 200  $\mu\text{L}$  de réactif Bio-Rad Protein Assay®. Les échantillons sont ensuite homogénéisés et incubés pendant 5 min à température ambiante. La lecture se fait à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La quantité de protéines est estimée grâce à une gamme de BSA, réalisée en parallèle. Les extraits protéiques (10  $\mu\text{g}$ ) sont dilués dans un tampon Laemmli (Tris HCl 500 mM pH 6,8, bleu de bromophénol 0,001 %, SDS 4 %, glycérol 20 %), puis dénaturés pendant 5 min à 95°C pour être déposés en quantité égale dans chaque puits.

#### 2.4.2.3 Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation a été réalisée avec le réactif ImmunoCruz™ IP/WB Optima B System (sc-45039, Santa Cruz) selon les indications du fabricant. Après la préparation des extraits protéiques de PNN provenant de péritonite, l'immunoprécipitation se fait selon les étapes suivantes:

- **Etape 1:** formation du complexe matrice d'immunoprécipitation (IP) / anticorps IP (anti facteur tissulaire : 4502 (American Diagnostica). 50  $\mu\text{L}$  de la matrice IP, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anticorps IP et 500  $\mu\text{l}$  de PBS sont incubés une nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, la matrice IP / anticorps IP est collectée après centrifugation à 1000g pendant 30s à 4°C. Le surnageant est éliminé délicatement puis le culot est lavé 2 fois par centrifugation à 1000g pendant 30s à 4°C.
- **Etape 2:** 50  $\mu\text{L}$  de la matrice "Precogning" est ajouté à 1 mL de lysat cellulaire. Après incubation pendant 30 min à 4°C, le mélange est centrifugé à 1000g pendant 30s à 4°C.
- **Etape 3:** Le surnageant est transféré dans un tube, et incubé avec la matrice IP / anticorps IP sous agitation à 4°C. Après 2h d'incubation, le culot est lavé puis mis en suspension dans 40  $\mu\text{L}$  de tampon Laemmli, puis dénaturé pendant 5 min à 95°C.

#### **2.4.2.4 Immunodétection des protéines: western-blot**

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS à 10%. La migration s'effectue pendant 90 min à 30 mA dans un tampon de migration (Tris 25 mM pH 8,3, SDS 0,1 % (m/v), glycine 192 mM). Les protéines sont ensuite transférées pendant 60 min, à 350 mA sur une membrane d'immunorévélation (PVDF).

La membrane est ensuite incubée pendant 60 min, à température ambiante dans une solution de saturation composée de lait écrémé à 5% dans du TBS-T. Puis, la membrane est incubée pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-FT à 1 mg/mL (4509 American Diagnostica®) dilué au 1/1000 dans la solution de saturation. Le lendemain, après 3 lavages de 10 min en TBS-T, la membrane est incubée pendant 60 min à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase dirigé contre l'anticorps primaire et dilué dans la solution de saturation. Après 3 lavages de 10 min en TBS-T et d'un lavage de 10 min en TBS, les protéines sont révélées par chimioluminescence (kit ECL™). Le contrôle des dépôts a été réalisé par l'expression de la  $\beta$ -actine (4970 cell signaling®).

#### **2.4.2.5 Dosage de l'antigène FT**

L'antigène FT des cellules adhérentes est mesuré sur les cellules lysées, afin de doser la quantité totale de FT présente. Ce dosage est effectué à l'aide d'une trousse commerciale ELISA : 100  $\mu$ L de lysat cellulaire sont déposés dans les puits de la microplaque et techniqués selon les recommandations du fabricant (FIII Quantikine, R&D Systems). Ce test est basé sur un dosage immuno-enzymatique indirect. La plaque est recouverte d'un anticorps monoclonal spécifique du FT. Pour la détection, un anticorps polyclonal FT couplé à une enzyme est utilisé. L'échantillon contenant le FT à doser est capté simultanément par ces deux anticorps.

- **Protocole expérimental**

A partir du standard contenant une quantité connue de FT 5000 pg/mL, une dilution au 1/10, puis 6 dilutions au 1/2 en cascade sont réalisées. Les concentrations sont déterminées à partir de la courbe standard. Les résultats sont exprimés en ng de FT/g de protéine. Les dépôts sont effectués en double (Tableau 7).

Echantillon (protéines cellulaires) ou Standard FT	200 µL
<b>Incuber pendant 2 heures à température ambiante sous agitation</b>	
<b>Laver 4 fois en solution de lavage, puis ajouter :</b>	
Anticorps secondaire polyclonal anti-FT couplé à la peroxydase (HRP)	200 µL
<b>Incuber pendant 2 heures à température ambiante sous agitation</b>	
<b>Laver 4 fois en solution de lavage, puis ajouter :</b>	
Substrat H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / substrat chromogénique (tetramethylbenzidine) préparé extemporanément	200 µL
<b>Incubation pendant 30 min à l'obscurité</b>	
Arrêt de la réduction (Acide sulfurique 2N)	50 µL
<b>Mesure de l'absorbance à 450 nm dans les 30 min</b>	

**Tableau 7 : Protocole expérimental du dosage antigénique de FT par ELISA**

### **2.4.3 Analyse en microscopie à fluorescence**

#### **2.4.3.1 Principe de la fluorescence**

Des molécules, appelées fluorophores ou fluorochromes, sont capables d'émettre de la fluorescence, lorsqu'elles sont excitées par un rayonnement à une certaine longueur d'onde. Au moment de l'interaction des fluorochromes avec les photons lumineux, les molécules passent d'un état fondamental à un état excité et l'énergie augmente de façon transitoire. En retournant de nouveau à l'état basal, ces molécules émettent de la lumière (fluorescence) à une longueur d'onde supérieure à celle d'excitation avec une perte d'énergie sous forme de chaleur. La longueur d'onde d'émission est supérieure à la longueur d'onde d'excitation (Alexa Fluor 488, excitation 488 nm et émission 510-536nm).

Le microscope à fluorescence est composé principalement d'une source excitatrice (lampe à vapeur de mercure), d'un jeu de filtres (filtre d'excitation et filtre d'émission) et d'un miroir

dichroïque. La microscopie à fluorescence repose donc sur la formation d'une image par la détection de la fluorescence émise par l'échantillon.

### **2.4.3.2 Immunomarquage**

Après stimulation des PNN pendant 4 h en présence de l'IL-8+TNF, on réalise une lame par "cytopspin". Les cellules sont fixées pendant 15 min avec du formaldéhyde 4%, après trois lavages de 5 min dans du PBS. Les cellules sont incubées pendant 30 min, à température ambiante dans une solution de saturation (PBS contenant 3% de BSA). Les cellules sont ensuite incubées toute la nuit à 4 °C, en présence de l'anticorps primaire anti FT dilué au 1/200 dans du PBS contenant 3% de BSA. Après 3 lavages de 5 min en PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor® 488, dilué au 1/1000 dans du PBS. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois 5 min dans du PBS.

Pour visualiser le noyau, une contre coloration est réalisée à l'hématoxyline à la fin de l'immunomarquage du FT. Les lames sont rincées pour éliminer l'excédent de l'hématoxyline. Une goutte "*d'anti-fading*" est déposée sur chaque lame puis recouverte avec une lamelle et "lutée". Les lames sont conservées à l'obscurité et à 4°C.

Afin de réaliser les marquages sur les membranes de dialyseur, le circuit est rincé avec 2,5L mL de PBS. L'hémodialyseur est récupéré après clampage et section des lignes artérielle et veineuses. Le compartiment dialysat est vidé. Au laboratoire, on réalise une découpe à chaque extrémité de l'hémodialyseur, à l'aide d'une scie circulaire motorisée. Les plaques de l'hémodialyseur sont ainsi extraites de la coque qui les enferme. Ces échantillons sont lavés pendant 5 min, à 3 reprises en PBS, puis fixés avec du formaldéhyde 4%. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites ci-dessus. L'anticorps anti histone H3 citrulline, est dilué au 1/200. Une coloration nucléaire au DAPI est réalisée. L'observation est menée en microscopie à fluorescence.

Pour chaque immunomarquage, une lame contrôle correspondant à l'incubation des cellules avec l'IgG contrôle a été réalisée; ceci permet de vérifier la spécificité de l'anticorps utilisé.

### **2.4.4 Mesure de l'activité FT**

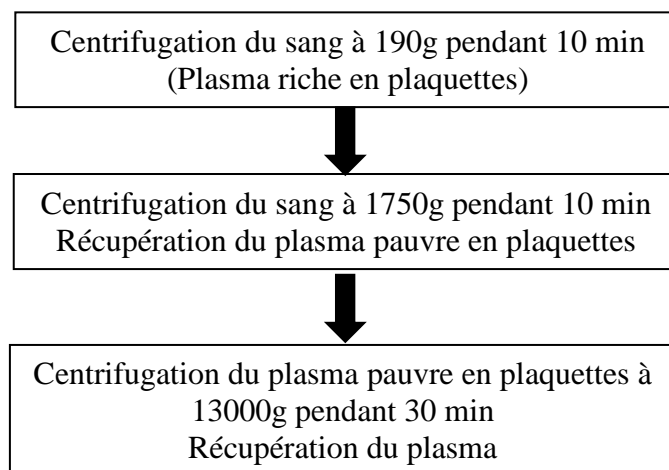
#### **2.4.4.1 La thrombinographie**

C'est la mesure de l'activité thrombinique en fonction du temps, grâce à l'enregistrement continu de la fluorescence libérée lors du clivage d'un substrat fluorogène spécifique de la thrombine.



### Préparation de plasma

Le sang des donneurs est recueilli dans des tubes monovette® (Sarstedt) contenant une solution de citrate 106 mM à raison d'1 volume de citrate pour 9 volumes de sang. La préparation du plasma est réalisée selon le protocole suivant (Figure 25):



**Figure 25 : Protocole de préparation du plasma**

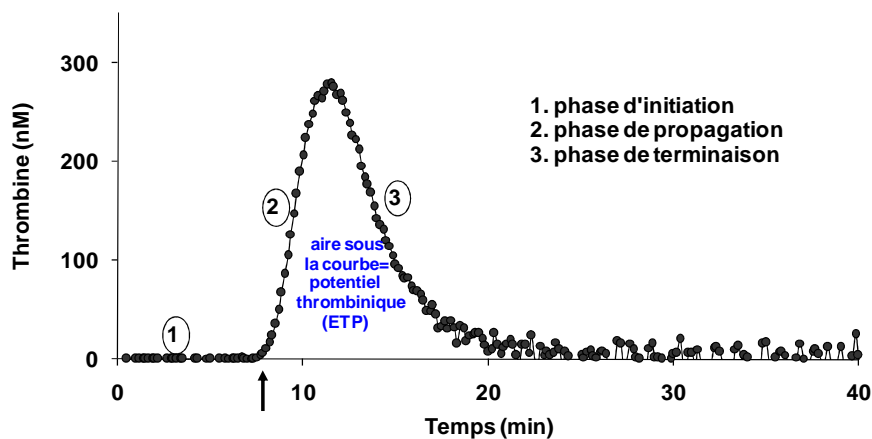
Les mesures thrombinographiques sont réalisées grâce à un fluorimètre Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems, Helsinki, Finland) doté d'un logiciel Thrombinoscope version 2.106 (Synapse, Maastricht, Pays-Bas), qui permet d'enregistrer la fluorescence. Les mesures sont effectuées avec une longueur d'onde d'excitation à 390 nm, une longueur d'onde d'émission à 460 nm et un intervalle de mesure de 15s. Un calibrant (mélange d'un complexe  $\alpha$ 2-macroglobuline/thrombine humaine à 660 nM) permet la conversion des unités de fluorescence obtenues en concentrations molaires de thrombine active. Il permet également de corriger les effets de consommation du substrat de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC), de l'influence des facteurs optiques intrinsèques du plasma, de l'appareillage et des consommables.

Les mesures sont déclenchées par l'addition par le fluorimètre de 20  $\mu$ L d'un mélange de substrat fluorogène et de  $\text{CaCl}_2$  (100 mM). Les mesures sont réalisées en triple dans des microplaques 96 puits en polypropylène, fond rond (Stago).

La cinétique de génération de thrombine enregistrée est appelée thrombinogramme et se décompose en trois phases : initiation, propagation et terminaison (Figure 26).

**Le temps de latence de génération de thrombine** (initiation): il correspond à la durée de la phase d'initiation (en min), dont l'acteur majeur est le FT. Au cours de cette phase le FT

exprimé par les cellules est mis en contact avec les facteurs de coagulation circulants dans le plasma. Le complexe FT-FVIIa active le FX en FXa. Ce dernier forme avec le FXa le complexe prothrombinase qui est à l'origine de la génération des premières molécules de thrombine. En l'absence de FT, le système de la coagulation ne se déclenche pas. Les premières traces de thrombine vont **amplifier la génération de thrombine** (propagation) par l'activation du facteur VIII (FVIII) en facteur VIIIa (FVIIIa) et du FV en FVa. La thrombine active également le FXI en FXIa, qui active à son tour le facteur FIX en FIXa. Ce dernier active le FX. **L'inhibition ou la régulation de la génération de thrombine**, se fait essentiellement par l'antithrombine (AT), inhibiteur de la thrombine libre. L'AT est également capable d'inhiber les facteurs Xa, IXa, XIa et XIIa. Le TFPI inhibe les facteurs Xa, VIIa et FT. Le complexe Protéine C/Protéine S/Thrombomoduline, va pouvoir activer la PC en PCa. Cette dernière pourra inhiber les facteurs Va et VIIIa en présence de son cofacteur la protéine S. Le TFPI est un inhibiteur majeur de la phase d'initiation alors que l'AT et le système PC/PS/TM ont des actions inhibitrices majoritairement au niveau de la phase de propagation (Figure 26).



**Figure 26 : Cinétique de génération de thrombine**

Dans nos conditions expérimentales, la coagulation est déclenchée en présence de 10  $\mu$ L de cellules ( $5 \cdot 10^6$  cellules/mL), de 10  $\mu$ L de phospholipides à 100 mmol/L (20% de phosphatidyl-sérine, 20% de phosphatidyl-éthanolamine et de 60% de phosphatidyl-choline

(Avanti Polar Lipids Inc. Coger, Paris, France)) et 80  $\mu$ L de plasma déplaqueté supplémenté en aprotinine à une concentration finale de 300 KIU/mL (inhibiteur de la phase contact) et en absence de FT exogène. A chaque expérience, une calibration est réalisée en présence de 20  $\mu$ L de calibrant et 80  $\mu$ L de plasma. La fluorescence est mesurée en temps réel à 37°C.

#### 2.4.4.2 Dosage de l'activité fonctionnelle du FT (par génération de Xa)

Le dosage a été réalisé selon les indications du fabricant de la trousse commerciale (ACTICHROME<sup>®</sup> TF American diagnostica) (Tableau 8). Les dépôts s'effectuent en double dans une plaque 96 puits Nunc « Polysorb ». Une gamme étalon constituée de FT lipidé (de 0 à 30 pM) est réalisée, afin de déterminer les concentrations en FT des échantillons. Les résultats sont exprimés en nM de FT/g de protéine.

Echantillon (protéines cellulaires) ou Standard FT	25 $\mu$ L
Facteur VIIa	25 $\mu$ L
Facteur X	25 $\mu$ L
<b>Incuber 15min à 37°C</b>	
Spectrozyme Xa	25 $\mu$ L
<b>Incubation 30 min à 37°C</b>	
Arrêt de la réaction (acide acétique glacial)	50 $\mu$ L
<b>Mesure de l'absorbance à 450 nm</b>	

**Tableau 8 : Protocole expérimental du dosage fonctionnel de FT par ELISA**

# RESULTATS

### 3. RESULTATS :

#### 3.1. ARTICLE SOUMIS A LA REVUE KIDNEY INTERNATIONAL, SOUS LE TITRE :

##### **" Tissue factor expressed by adherent cells contributes to hemodialysis-membrane thrombogenicity"**

Le premier objectif de ce travail était de caractériser les cellules sanguines adhérentes à la membrane de dialyse puis d'analyser leur activation, notamment en termes d'activité procoagulante et d'expression de FT.

Nous avons donc développé une technique de récupération des cellules ayant adhéré à la membrane de dialyse.

Utilisant des techniques morphologiques et de cytométrie en flux, nous avons montré :

- que les cellules ayant adhéré à la membrane sont majoritairement des PNN
- que ces PNN sont fortement activés, puisqu'ils expriment fortement des marqueurs tels le CD11b, CD63 et CD66b. D'autre part, des agrégats hétérotypiques PNN-plaquettes sont identifiés.

Nous avons mis en évidence une expression de FT par les cellules adhérentes à la membrane de dialyse par western blot. Ces résultats ont été confirmés par une étude quantitative de FT par ELISA dans les lysats obtenus à partir de cellules adhérentes. Le niveau d'expression du FT est bien supérieur à celui des cellules circulantes. Utilisant une technique de RT-PCR quantitative, nous montrons un niveau d'expression élevé de l'ARNm du FT dans les cellules adhérentes. Cette expression des ARNm est corrélée au niveau d'expression protéique de FT. Nous avons ensuite évalué le potentiel procoagulant du FT par le dosage de l'activité du FT et le test de génération de thrombine, confirmant l'activité fonctionnelle de la protéine FT.

Les études en microscopie à fluorescence nous ont permis de mettre en évidence la formation de *Neutrophil Extracellular Traps* ou « NETs » dans les dialyseurs, témoignant d'une forte activation de PNN. Ces NETs expriment le FT.

En conclusion, les PNN adhèrent aux membranes d'hémodialyse. Ils sont activés et expriment fortement le FT. Outre l'adhésion des PNN, le phénomène de NETose participe à la thrombogénicité.

Le deuxième objectif de ce travail était de mettre en évidence l'expression de FT dans les PNN provenant de sujets volontaires sains. Ces PNN ont été purifiés par gradient de densité, à partir de sang périphérique, puis stimulés avec l'IL-8 et le TNF $\alpha$ . Nous avons déterminé la pureté de ces populations par cytométrie en flux.

Nos résultats montrent :

- que le TNF induit l'expression de FT (ARNm et protéine)
- que L'IL-8 agit comme agent de priming pour l'expression de FT (ARNm et protéine) induite par le TNF.
- que l'anticorps anti- $\beta$ 2 integrine (anti CD18) diminue l'expression de FT par les PNN activés avec le TNF
- que les voies de signalisation ERK, MAP p38 et les radicaux libres, sont impliqués dans la production de FT par les PNN stimulés avec le TNF (présenté en annexe).

En conclusion, les PNN, expriment le FT, dans des conditions inflammatoires.

Les expériences réalisées chez la brebis apportent par des arguments *in vivo* la preuve du concept que l'inhibition du facteur tissulaire est efficace dans l'anticoagulation au cours de l'hémodialyse. Le FVIIai, aux doses utilisées dans la présente étude, n'a pas d'effet sur les tests globaux d'exploration de la coagulation (TCA, TQ), suggérant un potentiel hémorragique très limité.

Nous montrons donc que le FT et la voie extrinsèque jouent un rôle majeur dans la coagulation en hémodialyse et qu'il est possible d'inhiber cette voie sans modifier la coagulation sanguine.



## Tissue factor expressed by adherent cells contributes to hemodialysis-membrane thrombogenicity

Journal:	<i>Kidney International</i>
Manuscript ID:	KI-06-14-0886
Manuscript Type:	Basic Research
Date Submitted by the Author:	11-Jun-2014
Complete List of Authors:	Lakbakbi, Souad; University of Reims, EA3801 HERVI Debrumetz, Alexandre; Centre hospitalier Universitaire, Nephrology Terry, Christine; University of Reims, Palteforme imagerie cellulaire et tissulaire Szymezak, Jean; University of Reims, EA3801 HERVI Rieu, Philippe; Centre hospitalier Universitaire, Nephrology; Hopital Maison Blanche, Nephrology Nguyen, Philippe; University Hospital of Reims, Laboratory of Hematology; University of Reims, EA3801 HERVI
Keywords:	hemodialysis, anticoagulation
Subject Area:	Dialysis

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3 **Tissue factor expressed by adherent cells contributes to**  
4  
5  
6 **hemodialysis-membrane thrombogenicity**  
7

8  
9 Souad Lakbakbi,<sup>1</sup> Alexandre Debrumetz,<sup>2</sup> Christine Terryn,<sup>3</sup> Jean Szymezak<sup>1</sup>, Philippe Rieu,<sup>2</sup>  
10 and Philippe Nguyen<sup>1</sup>  
11

12  
13  
14  
15 <sup>1</sup>Equipe d'accueil 3801 Hémostase et Remodelage Vasculaire Post-Ischémie, Université de Reims,  
16 France; <sup>2</sup>Centre Hospitalier Universitaire, service néphrologie, Reims France; and <sup>3</sup>Plateforme  
17 Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Université de Reims, France  
18  
19

20  
21  
22  
23  
24 Text word count: 3348 words (21,844 characters)

25  
26 Abstract word count: 186 words (1,322 characters)

27  
28 Number of figures: 6 + 1 supplementary figure

29  
30 Number of tables: none

31  
32 Number of references: 30  
33

34  
35  
36  
37 Corresponding author:

38  
39 Pr. Philippe NGUYEN

40  
41 Address: CHU de Reims, Laboratoire Central d'Hématologie

42  
43 Hôpital Robert Debré - Avenue du Général Koenig - 51092 Reims Cedex

44  
45 E-mail : pnguyen@chu-reims.fr

46  
47 Tel.: +33 3 26 78 77 89

48  
49 Fax: +33 3 26 78 81 71  
50

51  
52  
53  
54  
55 Running headline: Inhibition of tissue factor prevent clotting during haemodialysis  
56  
57  
58  
59  
60



**Abstract:**

End-stage renal patients present high risk of thrombosis and bleeding. Consequently, it is challenging to prevent clotting during hemodialysis. If contact system induces thrombin generation in the extra corporeal circuit, recent data suggest a role of tissue factor (TF) in haemodialysis-associated thrombosis. Using a method of elution, we collected adhering cells to an acrylonitrile membrane layered by polythyleneimine (AN69-ST). Using optic microscopy and flow cytometry, we observed that adherent cells were mainly constituted by activated polymorphonuclear neutrophils (PMNs). Using a sensitive fluorogenic method of thrombin generation, we found that adhering cell triggered thrombin generation in a TF-dependent manner. We next identified the presence of TF mRNA (Q-PCR) in adhering cells. Using immunofluorescence, we observed the presence of TF in PMNs and of TF-decorated neutrophil extracellular traps (NETs). As TF triggers thrombin generation after binding to serine protease FVIIa, we evaluated the effect of an inactivated human recombinant factor VIIa (FVIIai) in a sheep model of hemodialysis (HD). One single bolus of FVIIai maintained full patency of the haemodialysis circuit without any measurable systemic anticoagulant effect. TF is a promising target for preventing thrombosis during HD.

**Keywords:** haemodialysis, anticoagulation

**Introduction:**

The prevention of clotting is a crucial issue in hemodialyzed-ESRD patients<sup>1</sup>. Early attempts at extracorporeal circulation used hirudin to prevent coagulation until heparin became the drug of choice. The major drawback of heparin is that it increases bleeding in ESRD patients who frequently present combined haemostatic disorders<sup>2</sup>. Low molecular weight heparins and fondaparinux have been used in such situations but remain contraindicated in ESRD patients<sup>3</sup>. In this context, the community has focused on improving the biocompatibility of hemodialysis (HD)

1  
2  
3 devices. Selective absorption of plasmatic proteins is a key event to assess the hemocompatibility  
4  
5 of biomaterials. High molecular weight kininogen and prekallikrein absorb on "negatively-  
6  
7 charged" hemodialysis membranes such as polyacrylonitrile, triggering the so-called "intrinsic  
8  
9 coagulation pathway". However, it was reported that thrombin generation induced by  
10  
11 extracorporeal circulation was comparable in factor XII (FXII)-deficient and -non deficient  
12  
13 patients <sup>4</sup>. This suggests an alternative pathway of thrombin generation during haemodialysis.

14  
15  
16 The contact of blood with biomaterials activates leukocytes and platelets. Material-induced  
17  
18 leukocyte activation results in increased adhesion <sup>5</sup>. This activation may induce the expression of  
19  
20 Tissue Factor (TF). TF is the major trigger of coagulation *in vivo*. Indeed, TF binds with a very  
21  
22 high affinity to coagulation factor VII(a) to form the so-called "extrinsic tenase complex" which  
23  
24 subsequently catalyzes the conversion of factor X to FXa and of factor IX to IXa. It is well-  
25  
26 established that monocytes can express TF <sup>6, 7</sup>. In contrast, the expression of TF by  
27  
28 polymorphonuclear neutrophils (PMNs) is controversial. Using immunostaining, Giesen was the  
29  
30 first to observe the presence of TF in PMNs but did not determine whether these cells could  
31  
32 synthesize or engulf TF <sup>8</sup>. The presence of TF in PMNs could result in the incorporation of TF-  
33  
34 bearing microparticles produced by other cells including activated monocytes <sup>9</sup>. In a model of  
35  
36 Arthus reaction in monkeys, TF mRNA was detected in PMNs by *in situ* hybridization <sup>10</sup>.  
37  
38 Furthermore, in a murine model of laser-induced endothelial injury, it was shown that PMNs  
39  
40 were the main cellular source of TF present in the thrombus <sup>11</sup>. The expression of TF by PMNs  
41  
42 was recently reported in ESRD patients <sup>12</sup>. In this report, TF expression was induced by  
43  
44 complement anaphylatoxin C5a, generated during HD. This suggests the paradigm that TF-  
45  
46 dependent pathway of initiation of coagulation may apply to dialysis membranes.  
47  
48  
49  
50

51  
52 In this report, we provide evidence that leukocytes adhere to an acrylonitrile membrane layered  
53  
54 by polythyleneimine (AN69-ST). Eluted adherent cells are able to trigger thrombin generation.  
55  
56 TF is highly expressed by these cells. PMNs represent the majority of adhering cells to the  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 dialyzer. We observed a phenomenon of NETosis of PMNs in contact with HD membranes. In a  
4  
5 sheep model of haemodialysis, we showed that inhibiting TF is effective in preventing thrombin  
6  
7 generation and clotting in HD patients.  
8

## 9 **RESULTS:**

### 10 **Characterization of cells adhering to dialyzer membranes:**

11  
12 The first step of our study was to determine whether circulating blood cells could adhere to the  
13  
14 membrane of the AN69-ST dialyzer. Adherent cells ( $22.10^6 \pm 10$  cells) mainly contained  
15  
16 leukocytes and platelet aggregates as observed in optical microscopy (Figure 1A). The  
17  
18 distribution of leukocytes was: PMNs ( $84 \pm 7\%$ ), monocytes ( $6 \pm 3\%$ ) and  $\sim 1\%$  of lymphocytes  
19  
20 (Figure 1B). PMNs activation was assessed by the expression of CD63, CD66b and CD11b  
21  
22 (Figure 1C). As expected, PMNs significantly overexpressed  $\beta 2$ -integrin CD11b as well as  
23  
24 degranulation markers CD63 and CD66b when compared to circulating PMNs (which were  
25  
26 considered as negative control). We observed a high level of heterotypic platelet-PMNs in eluted  
27  
28 adherent cells (Figure 1D).  
29  
30  
31  
32  
33

### 34 **Dialyzer-adherent cells can trigger thrombin generation (TG)**

35  
36 We evaluated the ability of dialyzer-adherent cells to trigger TG. For this, cells were eluted as  
37  
38 previously described and used as intact cells to trigger TG. We found that dialyzer-adherent cells  
39  
40 were able to trigger TG in the presence of aprotinine, a potent inhibitor of contact-activation  
41  
42 pathway (Figure 2A). TG supported by dialyzer-adherent cells was inhibited by a specific TF  
43  
44 antibody. Indeed, the lag time was significantly prolonged in the presence of neutralizing TF  
45  
46 antibody ( $10 \pm 0.9$  vs  $19 \pm 2$  min). Furthermore, TG supported by adherent cells in normal plasma  
47  
48 was delayed in the presence of FVIIai and null in FVII deficient plasma (Figure 2A).  
49

50  
51 We evaluated the ability of adherent cells to generate FXa. For this, we mixed cell lysates (as the  
52  
53 unique source of TF) with human FVIIa and human FX. In these conditions, FXa was generated  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 (494 ± 151nM TF/g protein). FXa generation supported by cell lysates was inhibited in the  
4 presence of specific neutralizing TF antibody (Figure 2B)  
5  
6

### 7 **Dialyzer-adherent cells contain high level of tissue factor mRNA**

8  
9 Next, we searched the presence of TF mRNA in dialyzer-adherent cells. We analyzed in parallel  
10 TF mRNA expression by circulating cells obtained from HD patients (before a HD session). We  
11 compared this expression with TF mRNA in purified PMNs and monocytes, obtained from  
12 healthy consenting donors. Purified PMNs, were activated by TNF- $\alpha$  (100ng/mL) or IL-8 (500  
13 ng/mL) or the combination of both. Monocytes were purified by elutriation as previously  
14 described<sup>13</sup>, and activated by LPS 100ng/mL. We found a high expression of TF mRNA in  
15 adhering cells whereas TF mRNA was moderate in circulating cells (negative controls) before  
16 HD (Figure 3). TF mRNA is not detected in unstimulated PMNs. On the contrary, TF mRNA  
17 were expressed at a high level in response to TNF alone or after priming with IL-8 combined with  
18 TNF. We confirmed that monocytes expressed low level of TF mRNA in the absence of  
19 stimulation. On the contrary, LPS dramatically induced TF mRNA expression.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

### 34 **Dialyzer-adherent cells contain high level of tissue factor protein**

35  
36 TF protein was measured in dialyzer-adherent cells lysates obtained from 9 patients. The amount  
37 of TF was estimated to be of 474 ±142ng/g of proteins which was significantly higher in  
38 comparison with circulating cells 158 ±20ng/g of protein; (p value=0.003). The presence of TF  
39 protein in AN69-ST adherent cells was confirmed by Western-blot in 4 different patients (Figure  
40 4c). We present for comparison western blots showing the expression of TF by purified PMNs  
41 (figure 4b) and monocytes (figure 4a), in the absence or after activation.  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

### 50 **Adherent neutrophils express TF and undergo a process of netosis during hemodialysis:**

51  
52 The presence of TF in AN69-ST adherent cells was visualized in immunofluorescence (Figure  
53 5B,D). As previously indicated, PMNs represented the majority of adherent cells and expressed  
54 TF. We observed the phenomenon of NETosis by these adherent PMNs (Figure 5E,F) as  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 visualized by DAPI and an antibody against citrulline-histone H3 (H3-Cit) (extracellular DNA  
4  
5 colocalized with H3-Cit) . We observed the presence of TF decorating NETs (Figure 5H).

6  
7 **TF inhibition by FVIIai prevents clotting and inhibits thrombin generation in a sheep**  
8  
9 **model of hemodialysis:**

10  
11 In order to assess the importance of TF in clotting during HD, we evaluated the effect of FVIIai in  
12  
13 a sheep model in comparison with UFH (see materials and methods). The bolus of FVIIai was  
14  
15 injected at the dose of 1mg/kg in the arterial line of the dialysis circuit. A continuous pre-/post-  
16  
17 dialyzer pressure monitoring was performed during the HD session (Figure 6B), an increase in  $\Delta P$   
18  
19 (pre-/post-dialyzer pressure difference) being proportional to the clotting obstruction of the  
20  
21 dialyzer <sup>14</sup>. After FVIIai bolus, no significant increase  $\Delta P$  was noticed during HD and  $\Delta P$   
22  
23 remained stable over the 4 hour-duration. The  $\Delta P$  profile was comparable with UFH. In contrast,  
24  
25 in the absence of anticoagulation,  $\Delta P$  dramatically increased at 80 min with an immediate  
26  
27 interruption of the session.  
28  
29

30  
31 We evaluated the effect of FVIIai on TG. We first spiked ovine plasma with 20 $\mu$ g/mL FVIIai and  
32  
33 observed that FVIIai could inhibit TG (Figure 6C). TG was measured at baseline and during HD  
34  
35 after FVIIai bolus infusion. We confirmed the inhibitory effect of FVIIai TG. Typical  
36  
37 thrombograms are shown on figure 6D, evidencing a prolongation of the lag time, 5 minutes after  
38  
39 FVIIai injection. This prolongation was persistent and even more pronounced with time. In  
40  
41 parallel, ETP decreased at 5 minutes and up to T240. In this experiment, thrombin peak decreased  
42  
43 from 72.41 nM at 5 minutes in this experiment to 35.02 nM at T240.  
44  
45

46  
47 We measured the FVIIai kinetics in this sheep model. FVIIai was measured by a commercial  
48  
49 ELISA kit, assaying the human FVIIAg. The assay does not detect any FVIIAg before the  
50  
51 administration of FVIIai, suggesting that it does not cross react sheep FVII Ag. In contrast, the  
52  
53 assay measures human recombinant FVIIai concentration which was 16.6 $\mu$ g/mL  $\pm$  2.7, 5 min  
54  
55 after bolus injection (Figure 6E). This concentration was 6.01 $\mu$ g/mL  $\pm$  0.6, 4 hours after bolus.  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 APTT and PT were measured on fresh PPP throughout the HD (Figure 6F,G). Before FVIIa  
4 bolus, APTT was  $22.1 \pm 1.3$  seconds and remained stable during the full course of haemodialysis.  
5  
6  
7 PT was performed using 2 thromboplastins with different sensitivity (international standardized  
8 index = ISI). Baseline PT was  $21.8 \pm 1.1$  seconds (ISI = 1.3) and  $16.7 \pm 1.2$  seconds (ISI=2).  
9  
10  
11 After administration of FVIIa, no significant prolongation was observed whatever the  
12  
13 thromboplastin.  
14

## 15 **DISCUSSION:**

16  
17  
18 Our study shows that TF is expressed by dialysis -membrane adherent cells with a high contribution of  
19 adherent PMNs. In a standardized model of sheep HD, we showed that inhibiting TF by FVIIa was  
20 effective in preventing clotting during HD and inhibiting TG without any significant systemic  
21 anticoagulant effect.  
22  
23  
24  
25

26  
27 The first step of our study was to characterize blood cells adhering to the dialysis membrane <sup>15, 16</sup>.  
28  
29 Adherent cells were mainly PMNs but monocytes were also present. This cell material was able to  
30 facilitate FX conversion to FXa and TG, in a TF-dependent way. We hypothesized that PMNs were the  
31 major source of TF but activated-monocytes or monocyte-derived microparticles could also be a source  
32 of TF <sup>17</sup>. Purified PMNs from healthy volunteers were studied as controls and we found that these cells  
33 do not express TF at baseline but do express TF in response to TNF, this expression being higher after  
34 a IL-8 priming in adherent conditions. Recently, it was reported that sera obtained from HD patients  
35 were able to stimulate PMNs to produce functionally active TF <sup>12</sup>. Furthermore, in an *in vitro* model,  
36 these authors reported that the contact of PMNs with HD filter fibers enhanced TF expression in a  
37 complement-dependent pathway.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48  
49 We observed that adhering PMNs over expressed CD11b, CD66b and CD63, in comparison to  
50 circulating PMNs studied before the HD session. This suggests a high potential of adherence and an  
51 advanced state of activation. Interestingly, it was reported that the expression CD11b expression was  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 co-regulated with TF expression <sup>12</sup>. In agreement with these data, the present study provides direct *ex*  
4  
5 *vivo* evidence showing the activation and TF expression of PMNs adhering to HD membrane.  
6

7  
8 When evaluating the expression of TF by purified PMNs from healthy individuals, we chose to use  
9  
10 TNF and IL-8 at high concentrations, in order to induce strong PMNs stimulation, as HD has been  
11  
12 described as a low-grade inflammatory condition <sup>18-21</sup>. We did not measure the level of TNF and IL-8  
13  
14 in the plasma of HD patients; however, TNF and IL-8 have been reported to be elevated in dialysis  
15  
16 patients, in a range of up to 18 mg/L <sup>22</sup>. Generally, plasmatic levels of cytokines may not reflect their  
17  
18 actual production and effect as these cytokines mainly have a paracrine effect. We next examined the  
19  
20 effect of IB4 monoclonal antibody (figure S1), a potent inhibitor of  $\beta$ 2-integrin and found a strong  
21  
22 inhibition of TNF-induced TF expression by PMNs obtained from healthy volunteers. Furthermore  
23  
24 manganese ( $Mn^{2+}$ ), a potent inducer of PMNs adhesion, failed to trigger TF mRNA expression. These  
25  
26 results suggest that a  $\beta$ 2-dependent outside-in signal is involved in the up regulation of TF by PMNs in  
27  
28 response to TNF.  
29  
30

31  
32 The accumulation of cell-associated TF within the dialyzer may play a crucial role in the initiation of  
33  
34 coagulation. So far, data concerning the role of TF in hemodialysis-related thrombosis are limited. As  
35  
36 NETs are considered to trigger thrombosis, we searched for a NET formation during HD. We did  
37  
38 observe the presence of NETs in the dialyzer membrane; these NETs are decorated with TF and this  
39  
40 indicates PMNs triggers coagulation during HD in part *via* a netosis process. Recent studies have  
41  
42 unveiled the critical implication of NETs in animal thrombotic models, and how the extracellular  
43  
44 release of DNA and protein components of NETs, such as histones and serine proteases, contributes to  
45  
46 coagulation and platelet aggregation. Furthermore, NETs components are essential factors in the  
47  
48 thrombus stability. Moreover, NETs indirectly promote coagulation by histones through a platelet  
49  
50 entrapment and activation <sup>23</sup>. NETs fibers contain various factors that can render them procoagulant.  
51  
52 The presence of neutrophil elastase leads to the inactivation of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) <sup>24</sup>.  
53  
54 Interestingly, the negatively charged DNA in NETs may provide a scaffold for Factor XII activation in  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 a factor XI-independent pathway. This indicates that NETs during HD could contribute to a TF-  
4 dependent triggering of coagulation and to interlinked mechanisms of amplification of TG and fibrin  
5 formation. NETs in plasma deserve to be studied as biomarkers during HD.  
6  
7

8  
9 In order to prove the concept of a TF involvement in the induction of clotting during HD, we evaluated  
10 the effect of an active site-inactivated factor VII (FVIIai). For this, we chose an *in vivo* model of ovin-  
11 hemodialysis which is currently used to assess HD membrane thrombogenicity<sup>25</sup>. Furthermore, sheep  
12 coagulation system is very similar to human<sup>26</sup>. FVIIai, is a modified recombinant factor VIIa with the  
13 active site irreversibly blocked: this molecule retains its TF binding capacity, but is enzymatically  
14 inactive<sup>27</sup>. FVIIai exerts its antithrombotic effect by competing with native factor VIIa for TF binding  
15 and consequently impeding TF/FVIIa activity. In rabbit and baboon models, FVIIai efficiently  
16 prevented TF-induced arterial thrombosis<sup>28,29</sup>. Our results show that a single injection of FVIIai, at the  
17 dose of 1 mg/kg of body weight, allowed to hold a HD session for 4 hours, without any effect on global  
18 coagulation tests (APTT and PT). To assess the absence of clotting, we monitored the pre-/post-dialyzer  
19 pressure variations. The monitoring curve obtained after FVIIai infusion was similar with heparin  
20 whereas the control curve obtained without any anticoagulation showed an abrupt elevation of pressure,  
21 at 80 minutes, corresponding to clotting, leading to the end of the session. The FVIIai concentration  
22 peak was 16µg/mL, 5 minutes after the end of the bolus. At this concentration, we observed a strong  
23 reduction in TF-induced TG characterized by a prolongation of the lag time and a decrease of the  
24 thrombin peak and ETP. Interestingly, whereas the lag time prolongation remained stable over the HD,  
25 the inhibitory effect on thrombin peak and ETP gradually increased overtime. The prolongation of the  
26 lag time is likely the reflect of a direct effect of FVIIai on TF triggering. The progressive effect of  
27 FVIIai on thrombin peak and ETP during the HD session could be the result of a FXa inhibition by  
28 TFPI. Indeed, TFPI is known to increase during HD. This increase is currently interpreted as secondary  
29 to heparin infusion<sup>30</sup>. In the absence of heparin, TFPI elevation may be the result of platelet release or  
30 endothelial stimulation.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 In conclusion, HD experiments in sheep confirm the role of TF in clotting the circuit of HD. Inhibition  
4 of TF could be an effective anticoagulation, without bleeding risk. Our results also indicate that the  
5 PMNs activation and adhesion to dialysis membrane could become a new therapeutic target for  
6  
7 preventing thrombosis in HD patients.  
8  
9

## 10 11 **METHODS**

### 12 13 **Reagents and antibodies:**

14 Phosphate buffered saline (PBS) (Biomerieux™), paraformaldehyde (PFA) (Electron Microscopy  
15 Sciences), Mouse Anti human H3-Cit monoclonal antibody clone (7C10) (Abcam,), mouse anti-  
16 human TF monoclonal antibody clone (IIID8), (4509 American Diagnostica), rabbit anti-human  
17 TF polyclonal antibody (4502 American Diagnostica),  $\beta$ -actin rabbit antibody (Cell Signaling),  
18 Polymorphprep™ (Axis Shield PoC AS). Interleukin 8 human (Sigma Aldrich), TNF $\alpha$ : Tumor  
19 Necrosis Factor (PeproTech™), anti CD18 antibody (IB4) (Calbiochem). Manganese (Alfa  
20 Aesar), Albumine from bovin serum sigma (BSA) (Sigma aldrich).  
21  
22

### 23 24 **Elution of adherent cells from the hemodialyzer membrane:**

25 Elution was adapted from Grooteman et al <sup>15, 16</sup>. The dialysis circuit (lines and AN69-ST dialyzer)  
26 was rinsed with 2.5L PBS, through the arterial line, at 200 mL/min. The circuit was filled with  
27 250 mL PBS containing 3mmol/L EDTA. This solution circulated in closed circuit for 20 minutes.  
28  
29 After centrifugation, pellets were pooled for cell counting.  
30  
31

### 32 33 **Neutrophil Isolation:**

34 PMNs were isolated from consenting healthy volunteers using Polymorphprep ®  
35  
36

### 37 38 **Western blotting:**

39 Details are available in supplementary Methods online  
40  
41

### 42 43 **Elisa TF expression:**

44 ELISA for measuring TF antigen in adherent cell lysate was performed using a commercial kit  
45 (Quantikine, R&D systems) according to the manufacturer's instructions.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Fluorescence microscopy:**

Details are available in supplementary Methods online

**Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR):**

Detail on RT-PCR reaction are found in supplementary methods online

**Fluorogenic measurement of thrombin generation and Xa generation assay:**

Details are available in supplementary Methods online

**TF Activity Assays:**

Actichrome TF activity assay (American Diagnostica ) was used to determine the TF activity of the lysates of adherent cells. Protein samples were applied as described in the manufacturer's manual. A standard curve was constructed by TF standard. The results are expressed as TF nM/g of protein.

***In vivo* sheep haemodialysis model:**

Experiments were conducted on 4 clinically healthy, female Texel adult sheep, weighing 68 kg - 73 kg. To conduct the vascular HD experiments, access was obtained by placing an arteriovenous shunt (catheters connected carotid artery and jugular vein), under general anaesthesia. Experiments were performed with HD device using a AN69-ST<sup>®</sup> hemodialyzer. The circuit was previously rinsed with isotonic saline and the dialysate compartment was filled with saline in the absence of flow. Blood circulated in this circuit at 37°C at a flow rate of 250 mL/min. HD was performed after the injection of either unfractionated heparin (UFH: 50 UI/kg bolus, followed by continuous infusion at the dose of 800 UI/h) or a single bolus of FVIIai (1 mg/kg) or saline. To assess circuit clotting,  $\Delta P$  was monitored, an increase in  $\Delta P$  indicating clotting (Figure 6A). During HD, blood samples were collected. The first blood sample was collected before the start of haemodialysis session. Further samples were collected after the administration of FVIIai bolus. The concentration of FVIIai in the sheep plasma was determined with enzyme-linked immunosorbent assay (Asserachrom<sup>®</sup> VII:Ag (Diagnostica Stago)).

**Coagulation Studies:**

To determine Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT), blood was collected in sodium citrate and centrifuged at 2500 g for 10 minutes to separate plasma.

Reagents: APTT: CK Prest<sup>®</sup> Reagent (Diagnostica Stago); PT: Neoplastine<sup>®</sup> CI Plus 5 (ISI=1.3), Neoplastine<sup>®</sup> CI 5 (ISI: 2) (both from Diagnostica Stago). Measurements were performed within 30 min after sampling.

The experimental conditions for TG measurement are described above. Sheep PPP was spiked with 10  $\mu$ L of TF human recombinant Innovin<sup>®</sup> (Siemens) at 1 pM.

**Statistical analysis Data:** Results were expressed as mean  $\pm$  SEM or box plots. Comparisons within the same groups were performed using a paired t test and Wilcoxon test. Statistical analysis was performed with Prism 5 software (GraphPad Software Inc). A p-value of  $< 0.05$  was considered as significant.

**Disclosure**

The authors declare no competing financial interests.

## References:

1. Yao Q, Axelsson J, Stenvinkel P, *et al.* Chronic systemic inflammation in dialysis patients: an update on causes and consequences. *ASAIO J* 2004; **50**: lii-lvii.
2. Lutz J, Menke J, Sollinger D, *et al.* Haemostasis in chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2014; **29**: 29-40.
3. Suranyi M, Chow JS. Review: anticoagulation for haemodialysis. *Nephrology (Carlton)* 2010; **15**: 386-392.
4. van der Kamp KW, Hauch KD, Feijen J, *et al.* Contact activation during incubation of five different polyurethanes or glass in plasma. *J Biomed Mater Res* 1995; **29**: 1303-1306.
5. Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* 2004; **25**: 5681-5703.
6. Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, *et al.* Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J Cell Biol* 1989; **109**: 389-395.
7. Rivers RP, Hathaway WE, Weston WL. The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes. *Br J Haematol* 1975; **30**: 311-316.
8. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, *et al.* Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 2311-2315.
9. Vijaya Mohan Rao L. Tissue factor in granulocytes: yes and NO. *Blood* 2008; **111**: 976-977.
10. Imamura T, Kaneda H, S N. New functions of neutrophils in the arthus reaction: expression of tissue factor, the clotting initiator, and fibrinolysis by elastase. *Lab Invest* 2002; **82**: 1287-1295.
11. Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, *et al.* Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 2012; **120**: 2133-2143.
12. Kourtzelis I, Markiewski MM, Doumas M, *et al.* Complement anaphylatoxin C5a contributes to hemodialysis-associated thrombosis. *Blood* 2010; **116**: 631-639.
13. Nguyen P, Broussas M, Cornillet-Lefebvre P, *et al.* Coexpression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes purified by leukapheresis and elutriation. Response of nonadherent cells to lipopolysaccharide. *Transfusion* 1999; **39**: 975-982.

- 1  
2  
3 14. Summerton JA, Collins GR. In vitro clotting technique for hemodialysis circuits. *ASAIO J* 1999; **45**: 109-112.
- 4  
5  
6 15. Grooteman MP, Bos JC, van Houte AJ, *et al.* Mechanisms of intra-dialyser  
7 granulocyte activation: a sequential dialyser elution study. *Nephrology, dialysis,*  
8 *transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant*  
9 *Association - European Renal Association* 1997; **12**: 492-499.
- 10  
11 16. Grooteman MP, Nube MJ, van Houte AJ, *et al.* Granulocyte sequestration in dialysers:  
12 a comparative elution study of three different membranes. *Nephrology, dialysis,*  
13 *transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant*  
14 *Association - European Renal Association* 1995; **10**: 1859-1864.
- 15  
16  
17 17. Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, *et al.* Granulocytes do not express but  
18 acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer.  
19 *Blood* 2008; **111**: 1208-1216.
- 20  
21  
22 18. Bergstrom J, Lindholm B, Lacson E, Jr., *et al.* What are the causes and consequences  
23 of the chronic inflammatory state in chronic dialysis patients? *Semin Dial* 2000; **13**:  
24 163-175.
- 25  
26 19. Bruunsgaard H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation.  
27 *J Leukoc Biol* 2005; **78**: 819-835.
- 28  
29  
30 20. Kalantar-Zadeh K. Inflammatory marker mania in chronic kidney disease: pentraxins  
31 at the crossroad of universal soldiers of inflammation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; **2**:  
32 872-875.
- 33  
34 21. Simmons EM, Himmelfarb J, Sezer MT, *et al.* Plasma cytokine levels predict  
35 mortality in patients with acute renal failure. *Kidney Int* 2004; **65**: 1357-1365.
- 36  
37 22. Rysz J, Banach M, Cialkowska-Rysz A, *et al.* Blood serum levels of IL-2, IL-6, IL-8,  
38 TNF-alpha and IL-1beta in patients on maintenance hemodialysis. *Cell Mol Immunol*  
39 2006; **3**: 151-154.
- 40  
41 23. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, *et al.* Extracellular histones promote  
42 thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet  
43 TLR2 and TLR4. *Blood* 2011; **118**: 1952-1961.
- 44  
45 24. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, *et al.* Reciprocal coupling of coagulation and  
46 innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 2010; **16**: 887-896.
- 47  
48 25. Bonnet JM, Cornet AC, Crost T, *et al.* Modèle expérimental d'hémodialyse chez le  
49 mouton vigile. *Revue Méd Vét* 2000; **151**: 221-230.
- 50  
51 26. Siller-Matula JM, Plasenzotti R, Spiel A, *et al.* Interspecies differences in coagulation  
52 profile. *Thromb Haemost* 2008; **100**: 397-404.
- 53  
54 27. Sorensen BB, Persson E, Freskgard PO, *et al.* Incorporation of an active site inhibitor  
55 in factor VIIa alters the affinity for tissue factor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 11863-11868.
- 56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 28. Golino P, Ragni M, Cirillo P, *et al.* Antithrombotic effects of recombinant human, active site-blocked factor VIIa in a rabbit model of recurrent arterial thrombosis. *Circ Res* 1998; **82**: 39-46.  
5  
6  
7  
8  
9 29. Jang Y, Guzman LA, Lincoff AM, *et al.* Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation* 1995; **92**: 3041-3050.  
10  
11  
12  
13 30. Naumnik B, Rydzewska-Rosolowska A, Mysliwiec M. Different effects of enoxaparin, nadroparin, and dalteparin on plasma TFPI during hemodialysis: a prospective crossover randomized study. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011; **17**: 480-486.  
14  
15  
16  
17  
18  
19

### 20 21 **Acknowledgments:**

22  
23 This work was supported by a grant from Hospal Gambro Industries, Meyzieu, France. SL  
24 was supported by a fellowship from Gambro. We are deeply indebted to Pr Jeanne-Marie  
25 Bonnet-Garin and Jean-Yves AYOUB, who prepared the sheep and organized the  
26 haemodialysis experiments, at the Ecole vétérinaire de Lyon, France. We thank Nathalie  
27 Philippe (Gambro Industries) who helped in the realization of sheep experiment. We thank  
28 Lars Petersen (Novo Nordisk, Denmark) for providing us FVIIai and for helpful discussion.  
29 We thank Pr Jacques CHANARD who carried out many studies in Reims in order to improve  
30 haemodialysis.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

### 40 41 **Authorship contributions:**

42  
43 P.N. designed the project, supervised the research, analyzed the data and wrote the  
44 manuscript.; S.L performed most of the research, collected and analyzed the data and  
45 contributed to the writing of the manuscript; A.D. performed the elution experiment and  
46 helped in flow cytometry and sheep experiments; C.T. performed fluorescence microscopy;  
47 JS. Analysed the data and contributed to the writing; P.R helped in the design, the analysis of  
48 data and contributed to discussion.  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**TITLES AND LEGENDS:**

**Figure 1. Cell distribution of adherent leukocytes on AN69-ST dialyzers.** (A) (Eluated-) adherent cells on AN69-ST dialyzers (optical microscopy after Giemsa staining). (B) Flow cytometry: cell distribution of adherent leukocytes. (C) Flow cytometry: Membrane markers CD11b, CD63 and CD66b on adherent PMNs (white) and on circulating PMNs (obtained from arterial line before a HD session) (black). Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) ratio (5 independent experiments \*p values<0.05 \*\*p values<0.01). (D) Flow cytometry: quantification of heterotypic platelet-neutrophil aggregates (expressing CD45 and P-selectin) (8 independent experiments \*\* p values<0.01).

**Figure 2. Adherent cells on AN69-ST dialyzers bear a functionally active TF.** (A) Thrombin generation (TG) induced by  $0.5 \cdot 10^6$  adherent cells to the dialysis membrane. Effect of anti-TF antibodies (Ab TF), FVIIai and FVII-deficient plasma on TG. (B) TF activity measured by a Xa-generation assay (Actichrom TF<sup>®</sup>); effect of anti TF antibody (4509) (6 independent experiments (\*p values<0.05).

**Figure 3. TF is expressed in adherent cells on AN69-ST dialyzers.** TF mRNA quantified using RT- QPCR in adherent cells, circulating cells before hemodialysis (HD) session, unstimulated PMNs from healthy individuals, PMNs stimulated with TNF- $\alpha$  (100ng/mL), or IL-8 (500ng/mL) + TNF (100ng/mL), unstimulated and stimulated monocytes



1  
2  
3 (LPS:100ng/mL). Results are expressed by calculating  $2^{-\Delta ct}$  (5 independent experiments (\*p  
4 values <0.05)  
5  
6  
7  
8

9  
10 **Figure 4. TF protein (47 kDa) detection in adherent cells on AN69-ST dialyzers .** (A) TF  
11 positive control was a mix of Thromborel® (45 kD, glycosylated TF) and Innovin® (34 kD,  
12 recombinant non glycosylated TF). TF protein evaluated from healthy human monocytes were  
13 purified by elutriation, and activated (LPS:100 ng/mL), (B) PMNs purified from healthy  
14 individuals, were stimulated with TNF- $\alpha$  (100ng/mL) or the combination of IL-8 (500ng/mL)  
15 + TNF (100ng/mL), and (C) adherent cells to dialysis membrane from 4 different patients P1-  
16 P4.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

25 **Figure 5. immunofluorescence microscopy of adherents cells on AN69-ST dialyzers.**  
26 PMNs were visualized by light microscopy (A,C) and by fluorescent microscopy using an  
27 antibody directed against human TF (B) and an Alexa 488–conjugated secondary antibody.  
28 Negative control was performed with an irrelevant antibody and the secondary antibody (D).  
29 NETs were visualized by immunofluorescence microscopy after DNA staining with DAPI  
30 (E,G), indirect labelling with an anti citrulline-Histone3 (F), an antibody directed against  
31 human TF antibody (H) and an Alexa 488–conjugated secondary antibody.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

43 **Figure 6. Effect of FVIIai in a sheep model of hemodialysis.** (A) Schematic representation  
44 of the extracorporeal blood circuit. (B) continuous monitoring of the pre- and post-dialyser  
45 pressure difference ( $\Delta P$ ): anticoagulation with unfractionated heparin, with FVIIai bolus (1  
46 mg/kg) or without any anticoagulation ( $\Delta P$  expressed in mm Hg). (C) representative thrombin  
47 generation curve obtained *in vitro* in sheep plasma in the absence and presence of FVIIai (20  
48  $\mu\text{g/mL}$ ). (D,E,F,G) Analysis of the sheep plasma receiving FVIIai during the hemodialysis  
49 sessions: (D) representative thrombin generation curve (E) FVIIai Antigen. (F) APTT. (G) PT.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5 **Supplementary material:**  
6

7 **Figure s1. Effect of adhesion on TNF-induced TF expression in PMNs.** (A) PMNs were  
8 pretreated with 10 µg/ml anti- β 2-integrin antibody (IB4) or IgG2a (30 min) and then  
9 incubated with TNF (2h). (B) Effect of manganese (Mn<sup>2+</sup>) (1 mM) in TF expression by PMNs.  
10  
11  
12  
13  
14 TF mRNA expression was measured by RT-QPCR (5 experiments; \*p values<0.05).  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**SUPPLEMENTARY MATERIAL: METHODS****Western blotting:**

Ten-microgram protein samples were loaded and separated by 10% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred to PVDF membrane (Biorad), and probed with mouse anti-human TF antibody (4509). Membranes were incubated with anti-mouse secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. Detection of the labeled proteins was performed by chemiluminescence using ECL from GE Healthcare.

**Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR):**

Total mRNA was extracted using the RNeasy Mini kit<sup>®</sup> (Qiagen). One  $\mu\text{g}$  RNA was reversely transcribed into cDNA with the iScript cDNA synthesis Kit<sup>®</sup> (Biorad).

The following primers and Taqman probes were used: TF (Hs00175225\_m1; Applied Biosystems) and  $\beta 2$  microglobulin (Hs00187842\_m1; Applied Biosystems) were used as endogenous controls. PCR mixture: PCR Master mix<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System- software V2.03. Results were normalized using the following formula:  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  corresponding to:  $\Delta\text{Ct}=(\text{target} - \beta 2\text{m})$ .

**Fluorescence microscopy:**

Adherent cells were cytocentrifugated for 10 minutes at 125g and fixed for 15 minutes at 4°C in PBS containing 4% PFA, then blocked for 30 minutes in PBS BSA 3% buffer and incubated at 4°C overnight with anti-human TF antibody or isotype control, followed by incubation 2 hours with an Alexa 488-conjugated secondary antibody. Between each step, cells were rinsed with PBS. Images were visualized by fluorescence microscopy (Zeiss Axiovert 200, Metamorph).

1  
2  
3 For NET staining, the dialysis membrane was extracted after the dismantling of the  
4 hemodialyzer. Adherent cells were fixed for 15 minutes at 4°C in PBS containing 4% PFA.  
5  
6 Cells were blocked for 30 minutes with PBS BSA 3% buffer and incubated at 4°C overnight  
7  
8 with the anti-human TF antibody or antibody against H3-Cit, followed by incubation with  
9  
10 secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488. To label DNA 4,6-diamidino-2-phenylindole  
11  
12 (DAPI) was used.  
13  
14

### 15 **Fluorogenic measurement of thrombin generation and Xa generation assay**

16  
17 TG test were performed as previously described (28). PPP was supplemented with aprotinine  
18  
19 (Sigma) at 300 kallikrein inhibitory units (KUI)/mL. Ten  $\mu\text{L}$  of cell suspension ( $5 \cdot 10^6$  cells/mL)  
20  
21 were added to 80  $\mu\text{L}$  of PPP. The fluorogenic substrate, Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem,  
22  
23 Switzerland) was added, and fluorometric determination of TG was performed using Fluoroskan<sup>®</sup>  
24  
25 Ascent plate reader (ThermoLabsystems, Finland). Thrombinoscope<sup>™</sup> software (Synapse BV,  
26  
27 The Netherlands) was used to calculate TG parameters: lag-time (min), thrombin peak (peak,  
28  
29 nM), endogenous thrombin potential (ETP, nM.min).  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

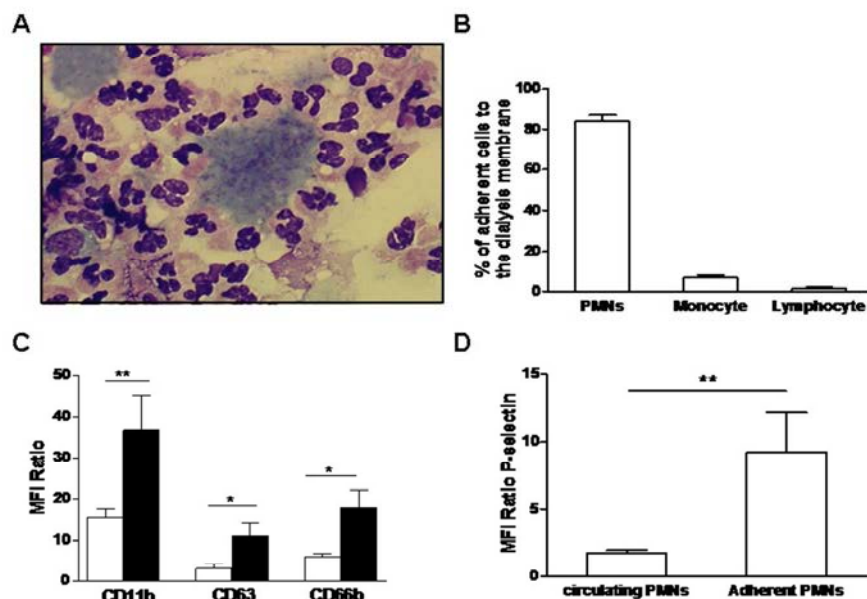


Figure1.

Cell distribution of adherent leukocytes on AN69-ST dialyzers. (A) (Eluated-) adherent cells on AN69-ST dialyzers (optical microscopy after Giemsa staining). (B) Flow cytometry: cell distribution of adherent leukocytes. (C) Flow cytometry: Membrane markers CD11b, CD63 and CD66b on adherent PMNs (white) and on circulating PMNs (obtained from arterial line before a HD session) (black). Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) ratio (5 independent experiments \*p values<0.05 \*\*p values<0.01). (D) Flow cytometry: quantification of heterotypic platelet-neutrophil aggregates (expressing CD45 and P-selectin) (8 independent experiments \*\* p values<0.01).

244x173mm (96 x 96 DPI)

LAKBAKBI et al

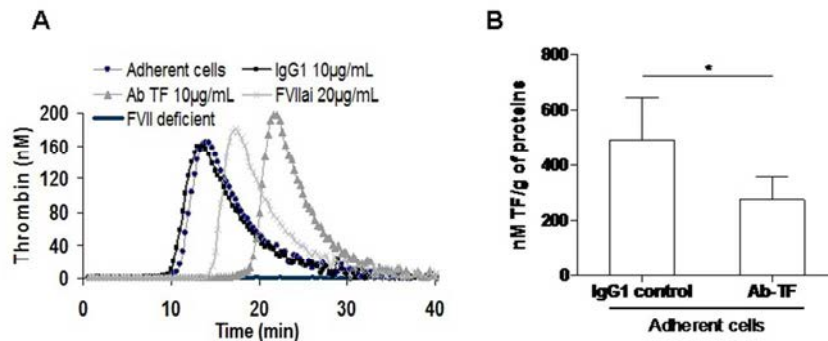


Figure 2.

Adherent cells on AN69-ST dialyzers bear a functionally active TF. (A) Thrombin generation (TG) induced by 0.5.106 adherent cells to the dialysis membrane. Effect of anti-TF antibodies (Ab TF), FVIIai and FVII-deficient plasma on TG. (B) TF activity measured by a Xa-generation assay (Actichrom TF®); effect of anti TF antibody (4509) (6 independent experiments (\*p values<0.05).  
246x158mm (96 x 96 DPI)

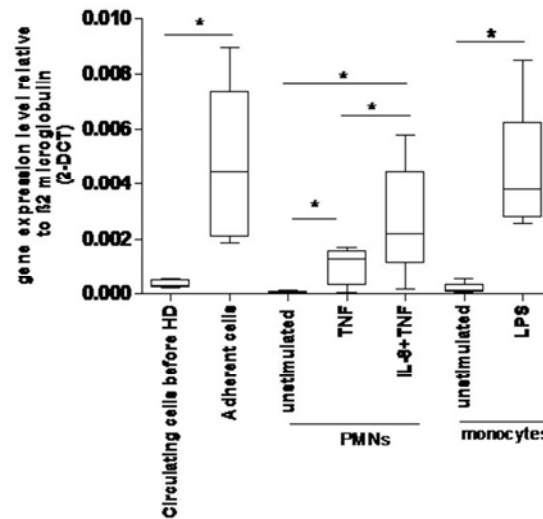


Figure 3.

TF is expressed in adherent cells on AN69-ST dialyzers. TF mRNA quantified using RT- QPCR in adherent cells, circulating cells before hemodialysis (HD) session, unstimulated PMNs from healthy individuals, PMNs stimulated with TNF- $\alpha$  (100ng/mL), or IL-8 (500ng/mL) + TNF (100ng/mL), unstimulated and stimulated monocytes (LPS:100ng/mL). Results are expressed by calculating  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (5 independent experiments (\*p values <0.05))

232x158mm (96 x 96 DPI)

LAKBAKBI et al

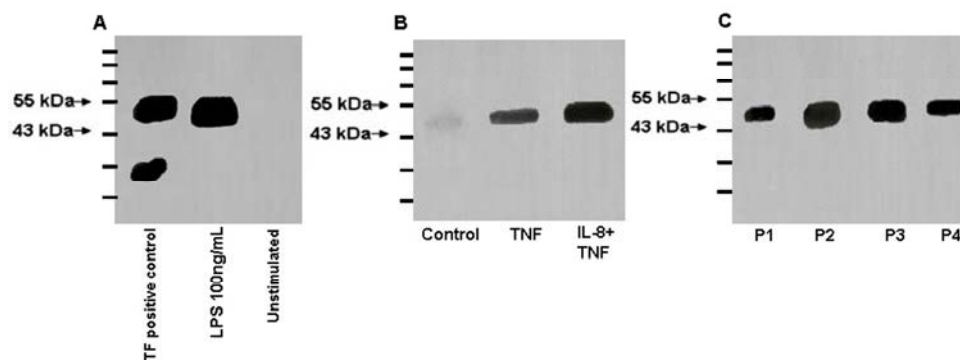


Figure 4.

TF protein (47 kDa) detection in adherent cells on AN69-ST dialyzers . (A) TF positive control was a mix of Thromborel® (45 kD, glycosylated TF) and Innovin® (34 kD, recombinant non glycosylated TF). TF protein evaluated from healthy human monocytes were purified by elutriation, and activated (LPS:100 ng/mL), (B) PMNs purified from healthy individuals, were stimulated with TNF- $\alpha$  (100ng/mL) or the combination of IL-8 (500ng/mL) + TNF (100ng/mL), and (C) adherent cells to dialysis membrane from 4 different patients P1-P4.

259x158mm (96 x 96 DPI)

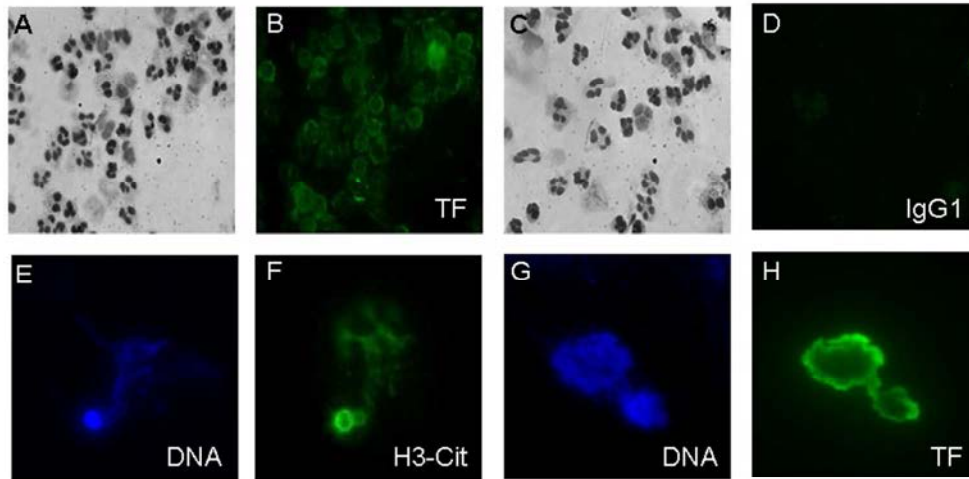


Figure 5.

immunofluorescence microscopy of adherent cells on AN69-ST dialyzers. PMNs were visualized by light microscopy (A,C) and by fluorescent microscopy using an antibody directed against human TF (B) and an Alexa 488-conjugated secondary antibody. Negative control was performed with an irrelevant antibody and the secondary antibody (D). NETs were visualized by immunofluorescence microscopy after DNA staining with DAPI (E,G), indirect labelling with an anti citrulline-Histone3 (F), an antibody directed against human TF antibody (H) and an Alexa 488-conjugated secondary antibody.  
238x163mm (96 x 96 DPI)



LAKBAKBI et al

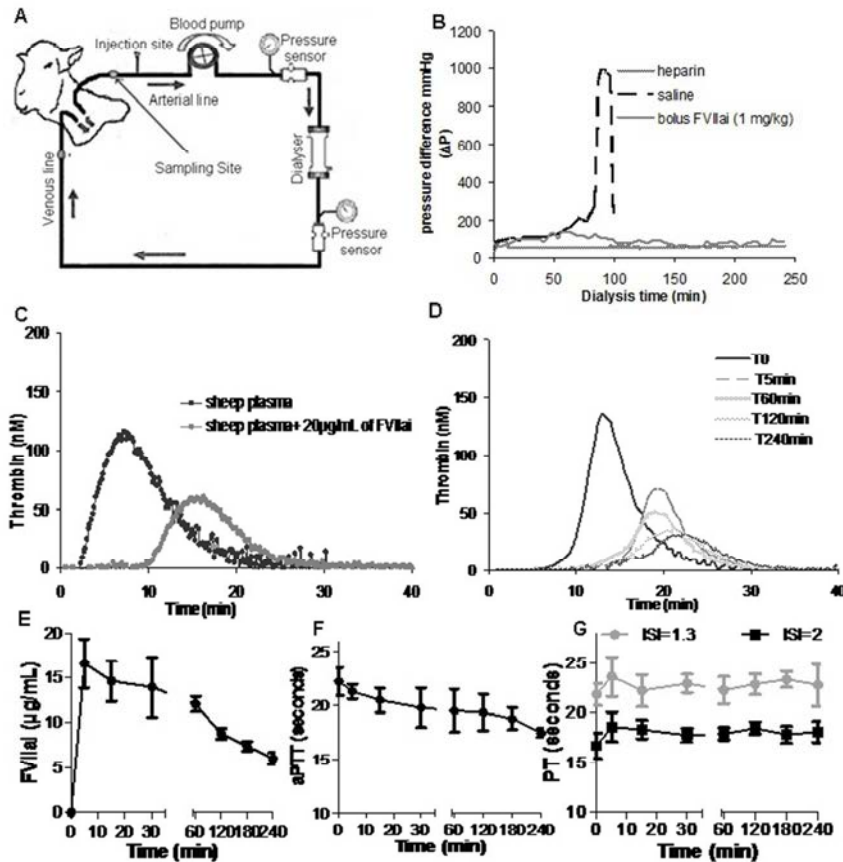


Figure 6.

Effect of FVIIai in a sheep model of hemodialysis. (A) Schematic representation of the extracorporeal blood circuit. (B) continuous monitoring of the pre- and post-dialyser pressure difference ( $\Delta P$ ): anticoagulation with unfractionated heparin, with FVIIai bolus (1 mg/kg) or without any anticoagulation ( $\Delta P$  expressed in mm Hg). (C) representative thrombin generation curve obtained in vitro in sheep plasma in the absence and presence of FVIIai (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). (D,E,F,G) Analysis of the sheep plasma receiving FVIIai during the hemodialysis sessions: (D) representative thrombin generation curve (E) FVIIai Antigen. (F) aPTT. (G) PT. 220x224mm (96 x 96 DPI)

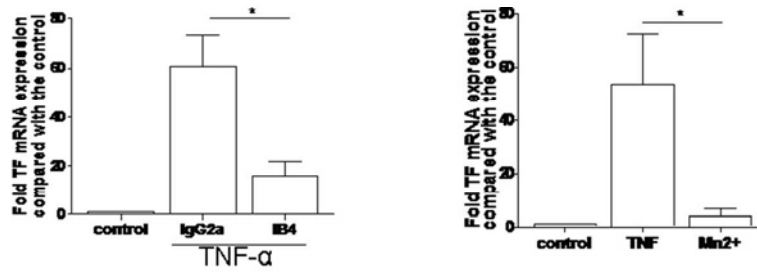


Figure s1.

Effect of adhesion on TNF-induced TF expression in PMNs. (A) PMNs were pretreated with 10  $\mu$ g/ml anti-  $\beta$ 2-integrin antibody (IB4) or IgG2a (30 min) and then incubated with TNF (2h). (B) Effect of manganese (Mn2+) (1 mM) in TF expression by PMNs. TF mRNA expression was measured by RT-QPCR (5 experiments; \*p values<0.05).

$\beta$   
244x158mm (96 x 96 DPI)

### 3.2. ARTICLE SOUMIS A LA REVUE JTH, SOUS LE TITRE :

#### **" Human neutrophils support thrombin generation in peritonitis"**

Nous avons utilisé un modèle *ex-vivo* à partir de PNN provenant de patients insuffisants rénaux, ayant développé une péritonite. Ces PNN ont été purifiés par une technique de tri par bille magnétique. Notre objectif était de confirmer les données obtenues *in vitro* avec les PNN provenant de sujets sains. Lors de la péritonite septique, les PNN migrent massivement dans la cavité péritonéale, en réponse à l'IL-8 et aux cytokines proinflammatoires, c'est-à-dire dans des conditions de stimulation très comparables à celles que nous avons choisies dans l'expérimentation *in vitro*. Nous montrons :

- que les PNN purifiés favorisent l'activation du FX et induisent la génération de thrombine,
- que le FT (ARNm et protéine) est présent dans ce matériel cellulaire.

Par ce modèle, nous évoquons la notion de coagulation extravasculaire et nous discutons du rôle du dépôt de fibrine en pathologie péritonéale.

journal of  
thrombosis and haemostasis

## Human neutrophils support thrombin generation in peritonitis

Journal:	<i>Journal of Thrombosis and Haemostasis</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Brief Report - Coagulation
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lakbakbi, Souad; University of Reims, EA3801 HERVI Debrumetz, Alexandre; Hopital Maison Blanche, Nephrology Rieu, Philippe; Hopital Maison Blanche, Nephrology NGUYEN, Philippe; CHU Reims 51092 Reims France, Laboratoire d'Hematologie
Please select Five Mandatory Key Words from the <a href="http://www.nlm.nih.gov/mesh/2014/mesh_browser/MBrowser.html" target="_blank">Medical Subject Headings List</a> :	dialysis, inflammation, neutrophils, peritonitis, tissue factor

1  
2  
3 **Title: Human neutrophils support thrombin generation in peritonitis.**

4  
5 **running head: Neutrophil procoagulant activity in peritonitis**

6  
7 **S.Lakbakbi\*, A. Debrumetz†, P. Rieu †and P. Nguyen§.**

8  
9  
10 \*University of Reims, EA3801 HERVI, †Hopital Maison Blanche, Nephrology, §CHU Reims  
11  
12 laboratoire d'Hematologie

13  
14  
15  
16  
17 **Abstract:**

18  
19 *Background:* In peritonitis, polymorphonuclear neutrophils (PMNs) represent predominant  
20  
21 infiltrating cells in the peritoneal cavity and act as the first line of defense against invading  
22  
23 bacteria. Coagulation have gained increasing attention in sepsis as fibrin deposition is a major  
24  
25 mechanism for bacterial entrapping . This fibrin deposition is likely the result of thrombin  
26  
27 generation. In addition to functioning as phagocytes and killer cells, it was recently shown that  
28  
29 PMNs can express Tissue factor (TF), the main trigger of thrombin generation. *Objectives:* To  
30  
31 investigate if PMNs present in the peritoneal fluid of patients presenting with peritonitis can  
32  
33 support thrombin generation. *Methods:* PMNs were obtained from 3 different patients with  
34  
35 peritonitis secondary to peritoneal dialysis. PMNs were isolated by immunomagnetic sorting. We  
36  
37 analyzed the ability of purified PMNs to support Xa- and thrombin generation. TF was searched  
38  
39 by Q-PCR, immunoprecipitation and western blot. *Results:* PMNs purified from peritoneal fluid  
40  
41 support Xa- and thrombin generation in a TF-dependent manner. PMNs strongly express TF  
42  
43 (mRNA and protein). *Conclusion:* PMNs are strongly procoagulant and express large amount of  
44  
45 TF in peritonitis. Our data illustrates that extravascular coagulation is involved in the  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
physiopathology of septic peritonitis indicating possible therapeutic targets.

54  
55 **Keywords:** dialysis, inflammation, neutrophils, peritonitis, Tissue factor.

**Introduction:**

In septic peritonitis, PMNs are abundant in the peritoneal cavity, as they play a crucial role in the innate host defense [1]. For sepsis-induced recruitment, PMNs have to migrate from the circulation to the site of infection in response to chemotactic factors including CXCL8 (IL-8), a very powerful chemotactic mediator [2]. Fibrin deposition is a major mechanism for bacterial entrapping [3]. This fibrin deposition is likely the result of thrombin generation. In the context of peritoneal dialysis (PD), fibrin deposition has been early recognized as a determining event in peritoneal sclerosis [4]. Furthermore, patients under DP are prone to septic peritonitis. Extravascular coagulation leading to fibrin deposition has been the subjected of limited investigations. Experimental models have documented the formation of thrombin in the peritoneum, indicating a plasmatic extravasation [5]. Thrombin inhibition is effective in preventing fibrin deposition in such models. However, the trigger of thrombin generation remains to be fully defined. As it has been recently described that PMNs play a major role in the initiation of thrombosis [6], we hypothesize that migrated PMNs directly support thrombin generation in peritonitis. To document this hypothesis, we had the opportunity to analyze neutrophils from peritonitis fluid. PMNs were obtained from 3 consenting patients presenting with terminal renal insufficiency and currently treated with peritoneal dialysis.

**Methods:****Neutrophil Isolation:**

Peritonitis fluid was obtained in patients presenting clinical symptoms of septic peritonitis as a complication of dialysis. Bacterial analysis of the fluid confirmed the presence of *Enterococcus* (in patient 1), *Streptococcus* (in patient 2), *Staphylococcus* and *Escherichia coli* (in patient 3). Neutrophils were studied before antibiotic treatment. For neutrophil isolation, monocytes were

1  
2  
3 depleted using magnetic microbeads conjugated to mouse monoclonal anti human CD-14  
4 antibodies (MACS, Miltenyi Biotec). Purity was 99 %.

#### 7 **Fluorogenic measurement of thrombin generation and Xa generation assay:**

9  
10 To assess procoagulant activity, a thrombin generation (TG) test was performed as previously  
11 described [7]. PPP was used, and supplemented with aprotinine (Sigma, France) at 300 kallikrein  
12 inhibitory units (KUI)/mL in order to block contact system. Ten  $\mu\text{L}$  of cell suspension ( $5 \cdot 10^6$   
13 cells/mL) were added to 80  $\mu\text{L}$  of PPP. Thrombin generation was performed in the presence of a  
14 specific antibody blocking the coagulant activity of TF (4509 American Diagnostica). The  
15 fluorogenic substrate, Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem, Switzerland) was added, and fluorometric  
16 determination of TG was performed using Fluoroskan<sup>®</sup> Ascent plate reader (ThermoLabsystems,  
17 Finland). Thrombinoscope<sup>™</sup> software (Synapse BV, The Netherlands) was used to calculate TG  
18 parameters: lag-time (min), thrombin peak (nM), endogenous thrombin potential (ETP, nM.min).  
19 We next measured the ability on PMNs to convert FX in FXa using a home-made chromogenic  
20 method (chromogenic substrate S-2765<sup>™</sup>).

#### 34 **Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR):**

35  
36 For TF mRNA identification, total mRNA was extracted (RNeasy Mini kit<sup>®</sup>, Qiagen) and  
37 reversely transcribed into cDNA (iScript cDNA synthesis Kit<sup>®</sup>, Biorad). The following primers  
38 and Taqman probes were used: TF (Hs00175225\_m1; Applied Biosystems) and  $\beta 2$  microglobulin  
39 (Hs00187842\_m1; Applied Biosystems) were used as endogenous controls. PCR mixture: PCR  
40 Master mix<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System-  
41 software V2.03. Results were normalized using the following formula:  $2^{-(\Delta\text{Ct}1-\Delta\text{Ct}2)}$  corresponding  
42 to:  $\Delta\text{Ct}1 = \text{Ct FT} - \text{Ct } \beta 2\text{m}$ ;  $\Delta\text{Ct}2 = \text{Ct FT} - \text{Ct } \beta 2\text{m}$  (1: Target, 2: control).

#### 52 **Immunoprecipitation and western blotting:**

53  
54 TF protein was detected by western blot and immunoprecipitation (IP): Ten-microgram protein  
55 samples were loaded and separated by 10% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred to PVDF  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 membrane (Biorad), and probed with mouse anti-human TF antibody (4509, American  
4 Diagnostica). Membranes were incubated with anti-mouse secondary antibody conjugated to  
5 horseradish peroxidase. Detection of the labeled proteins was performed by chemiluminescence  
6 using ECL from GE Healthcare. TF immunoprecipitation (IP) was realized by ImmunoCruz™  
7 IP/WB Optima B System (santa cruz biothechnology), according to the manufacturer's  
8 instructions. Two µg IP rabbit antibody anti-human tissue factor (4502, American Diagnostica)  
9 was used. Immunoprecipitated TF was detected by western blot with mouse anti-human tissue  
10 factor antibodies (4509).

## 21 **Results and discussion**

22  
23 Our observations indicate that PMNs purified from peritonitis fluid support thrombin generation  
24 in the absence of exogenous TF and in the presence of aprotinine (Fig. 1). This suggests the  
25 involvement of TF in PMN-supported thrombin generation. In agreement with this hypothesis, we  
26 noticed a reduction of the velocity of thrombin generation with a prolongation of the lag time and  
27 a decrease of the thrombin peak and the extrinsic thrombin potential (ETP). TF protein was  
28 visualized by western blot and immunoprecipitation to improve specificity. Moreover, we  
29 identified TFmRNA in purified PMNs and quantified the level of mRNA in comparison with  
30 unstimulated PMNs from healthy individuals: Delta Ct ratios were: Patient 1:63 Patient 2: 169,  
31 Patient 3: 247. Taken together, our results indicate that PMNs present in septic peritonitis fluid  
32 are procoagulant in a TF-dependent manner. To the best of our knowledge, it is the first time that  
33 TF is the main trigger of thrombin generation in human peritonitis. Animal models indicate that  
34 increased vascular permeability leading to plasma exudation is among the earliest signs of  
35 inflammation [5]. In peritoneal sclerosis, a “vasculopathy” has been described as a result of  
36 inflammatory stimulation due to peritoneal dialysis and resulting of progressive peritoneum  
37 deterioration. Infectious peritonitis could represent a second “hit” in the pathogenesis of  
38 encapsulating peritoneal sclerosis. Peritoneal macrophages could also play a role in peritonitis  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 and peritoneal sclerosis, as evidenced in a model of thioglycollate elicited-peritonitis. In this  
4  
5 model, it was shown that thrombin generation regulated chemokine and cytokine production. In  
6  
7 our experiments, we carefully selected PMNs, discarding CD14-positive cells.  
8

9  
10 Several issues should be kept in mind when interpreting our data. It was recently demonstrated  
11  
12 that TF/FVIIa pathway was involved in a mouse model of abdominal sepsis induced by  
13  
14 *Escherichia coli* [8] and that the inhibition of this pathway by recombinant nematode  
15  
16 anticoagulant protein c2 (rNAPc2) did reduce thrombin generation and fibrin deposition without  
17  
18 affecting the inflammatory or antibacterial sepsis. In experimental of polymicrobial peritonitis, it  
19  
20 was demonstrated that a peritoneal lavage with recombinant human antithrombin (rhAT) inhibited  
21  
22 coagulation and reduced neutrophil recruitment and local cytokine concentrations, ultimately  
23  
24 improving survival [9]. The inhibition of TF may therefore be useful to avoid fibrin deposition in  
25  
26 organs without compromising the host defence. However, the role of intra-abdominal fibrin is  
27  
28 ambiguous as it is an adaptive response precluding bacterial spread but it also enhances abscess  
29  
30 formation. Another issue regarding the importance of fibrin deposition is to elucidate whether  
31  
32 PMNs and TF are involved in peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis, in the absence of sepsis.  
33  
34 Peritoneal sclerosis is indeed a major complication of peritoneal dialysis associated with fibrin  
35  
36 deposition. It should be interesting to evaluate whether the inhibition of thrombin generation  
37  
38 inhibition is effective to prevent peritoneal sclerosis. Our data is a good example of the cross-  
39  
40 linking between coagulation and inflammation and illustrates that extravascular coagulation is  
41  
42 involved in the pathophysiology of peritonitis indicating possible therapeutic targets.  
43  
44  
45  
46

#### 47 **Addendum**

48  
49 S. Lakbakbi performed the experiments and wrote the manuscript, A. Debrumetz and P. Rieu  
50  
51 provided the patients' samples and patients' information and edited the manuscript, P. Nguyen  
52  
53 designed the experiments and wrote the manuscript.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Disclosure

The authors declare no competing financial interests.

## References:

- 1 Broche F, Tellado JM. Defense mechanisms of the peritoneal cavity. *Curr Opin Crit Care*. 2001; **7**: 105-16.
- 2 Craciun FL, Schuller ER, Remick DG. Early enhanced local neutrophil recruitment in peritonitis-induced sepsis improves bacterial clearance and survival. *J Immunol*. 2010; **185**: 6930-8.
- 3 van Veen SQ, Meijers JC, Levi M, van Gulik TM, Boermeester MA. Effects of intra-abdominal administration of recombinant tissue plasminogen activator on coagulation, fibrinolysis and inflammatory responses in experimental polymicrobial peritonitis. *Shock*. 2007; **27**: 534-41.
- 4 Honda K, Oda H. Pathology of encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int*. 2005; **25 Suppl 4**: S19-29.
- 5 Szaba FM, Smiley ST. Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood*. 2002; **99**: 1053-9.
- 6 Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frere C, Bonier R, Mackman N, Renne T, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood*. 2012; **120**: 2133-43.
- 7 Nguyen P, Broussas M, Cornillet-Lefebvre P, Potron G. Coexpression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes purified by leukapheresis and elutriation. Response of non adherent cells to lipopolysaccharide. *Transfusion*. 1999; **39**: 975-82.
- 8 Weijer S, Schoenmakers SH, Florquin S, Levi M, Vlasuk GP, Rote WE, Reitsma PH, Spek CA, van der Poll T. Inhibition of the tissue factor/factor VIIa pathway does not influence the inflammatory or antibacterial response to abdominal sepsis induced by *Escherichia coli* in mice. *J Infect Dis*. 2004; **189**: 2308-17.
- 9 van Veen SQ, Cheung CW, Meijers JC, van Gulik TM, Boermeester MA. Anticoagulant and anti-inflammatory effects after peritoneal lavage with antithrombin in experimental polymicrobial peritonitis. *J Thromb Haemost*. 2006; **4**: 2343-51.

**Legend:****Figure 1. TF is expressed in human purified PMNs obtained from peritonitis:**

**A:** Flow cytometry (FC500 Beckman Coulter): PMNs from peritonitis fluid, after monocyte depletion (cells are fluorescently stained with CD45-PC5). **B:** TF protein expression: Western blot analysis of protein extracts from elutriated human monocyte activated with LPS (100ng/mL) (positive control), purified PMNs from peritonitis fluid and TF immunoprecipitation (IP). **C:** TF activity measured by a home-made Xa generation amidolytic assay was measured on Xa-substrate. S-2765<sup>TM</sup>. One TF unit is defined as the activity of recombinant human TF (Innovin<sup>®</sup>) diluted at 1/1000. Effect of anti TF antibody (AbTF, 10µg/mL) (4509 American Diagnostica). **D:** TF Activity measured by thrombin generation assay (Calibrated automated thrombinography (CAT)<sup>®</sup>), effect of anti TF antibody (AbTF, 10µg/mL) (4509 American Diagnostica).

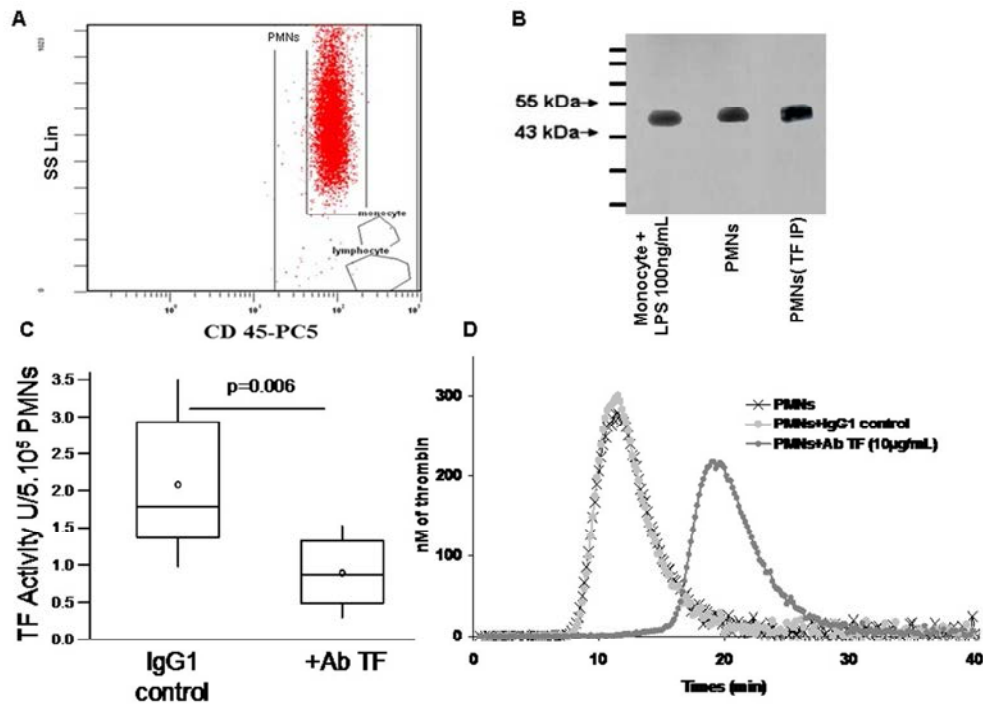


Figure 1

Figure 1. TF is expressed in human purified PMNs obtained from peritonitis:

A: Flow cytometry (FC500 Beckman Coulter): PMNs from peritonitis fluid, after monocyte depletion (cells are fluorescently stained with CD45-PC5). B: TF protein expression: Western blot analysis of protein extracts from elutriated human monocyte activated with LPS (100ng/mL) (positive control), purified PMNs from peritonitis fluid and TF immunoprecipitation (IP). C: TF activity measured by a home-made Xa generation amidolytic assay was measured on Xa-substrate. S-2765TM. One TF unit is defined as the activity of recombinant human TF (Innovin®) diluted at 1/1000. Effect of anti TF antibody (AbTF, 10µg/mL) (4509 American Diagnostica). D: TF Activity measured by thrombin generation assay (Calibrated automated thrombinography (CAT)®), effect of anti TF antibody (AbTF, 10µg/mL) (4509 American Diagnostica).

244x181mm (96 x 96 DPI)

# DISCUSSION GENERALE

#### 4. DISCUSSION GENERALE

Les études portant sur la coagulation des circuits d'hémodialyse, et plus généralement, des circuits extracorporels impliquant un contact du sang avec de biomatériaux, se sont longtemps focalisées sur l'implication de la voie intrinsèque. Différentes études, menées chez des patients déficitaires en FXII, ont remis en question l'hypothèse d'une activation exclusive de la voie dite « contact ». Nous avons émis l'hypothèse d'une activation de la voie extrinsèque au cours de l'hémodialyse. Notre approche expérimentale a été d'analyser les cellules ayant adhéré à la membrane d'hémodialyse.

Ainsi, nous avons montré qu'une membrane de dialyse est capable de concentrer les cellules sanguines, au cours de la dizaine de passages du sang, lors d'une séance d'hémodialyse. Les mécanismes qui régulent l'activation et l'adhésion des leucocytes au niveau de biomatériaux tels que les membranes d'hémodialyse, sont encore mal compris. Une hypothèse avancée est que les protéines s'adsorbent dans un premier temps, et que les leucocytes adhèrent secondairement aux protéines adsorbées. Dans notre étude, nous n'avons pas cherché à évaluer cette hypothèse, en mesurant ou en caractérisant la nature des protéines adsorbées. En revanche, nous avons montré que les leucocytes ayant adhéré à la membrane étaient majoritairement des PNN, les monocytes étant moins représentés et les lymphocytes absents.

La membrane que nous avons étudiée est une membrane synthétique en polyacrylonitrile de type AN69ST. Le phénotype des PNN ayant adhéré à cette membrane montre un état d'activation intense. L'expression de FT par les cellules adhérentes à la membrane de dialyse est beaucoup plus élevée que celle des cellules circulantes, telle que nous l'avons mesuré avant le début de la dialyse. Cela indique que l'expression de FT a été favorisée en cours d'hémodialyse. L'accumulation des PNN et du FT au sein de dialyseur pourrait jouer un rôle important dans l'initiation de la coagulation, puisque nous avons montré que le matériel cellulaire induisait une génération de thrombine et que le FT était fonctionnel. Les mécanismes d'activation et de l'expression de FT ne sont pas connus. Le rôle potentiel des endotoxines est exclu car ces endotoxines sont régulièrement contrôlées, et ce, de façon réglementaire.

Dans l'hémodialyseur, l'activation des PNN peut être médiée par plusieurs facteurs : directement par le contact avec la surface étrangère, par le système du complément, ou par les plaquettes. Toutefois, étant donné qu'une réponse inflammatoire de bas grade est constamment présente chez ces patients et que l'hémodialyse aggrave cette inflammation, il est probable que les médiateurs inflammatoires, y compris les cytokines, activent les

leucocytes. Nous n'avons pas étudié d'autres membranes que l'AN69ST, ni analysé l'effet de la greffe de l'héparine sur ce type de membranes. Les expériences ponctuelles que nous avons réalisées à partir de membranes AN69ST héparinées, ont retrouvé une accumulation leucocytaire comparable à l'accumulation observées sur les membranes non greffées (résultats non présentés).

Une des originalités de nos résultats a été de montrer la présence de NETs exprimant le FT au niveau des membranes de dialyse. La présence de NETs au niveau du dialyseur suggère une activation extrême des PNN, en cohérence avec l'expression de CD63 que nous avons mis en évidence. Les NETs pourraient favoriser l'accumulation des plaquettes et des globules rouges (116) mais également des protéines prothrombotiques comme la fibrine et le VWF. Il a été rapporté que le VWF était significativement élevé chez les patients hémodialysés et que cette élévation était corrélée au risque thrombotique (266).

Les protéines provenant des granules de neutrophiles (HNE, cathepsine G) sont présentes dans les NETs ; le co-assemblage de ces enzymes avec le TFPI, contribuerait à l'inactivation du TFPI (118). Il a été rapporté que le TFPI libre plasmatique était plus élevé chez le patient insuffisant rénal, en comparaison à des témoins sains (267). Cette élévation du TFPI pourrait témoigner d'une souffrance endothéliale, comme semble l'indiquer, par ailleurs, l'élévation du VWF et de la TM. Les NETs interfèrent avec l'activation de la PC par la TM. Il serait donc intéressant de compléter cette étude en analysant l'ensemble de ces protéines à la surface des membranes d'hémodialyse. L'importance du TFPI dans l'anticoagulation en cours d'hémodialyse a été évoquée dans plusieurs études. L'élévation du TFPI est constatée après administration d'HNF et d'HBPM (267-269). Ces études rapportent une corrélation inverse entre élévation de TFPI et concentration de fragments 1.2 de la prothrombine. Nos résultats suggèrent que le TFPI pourrait être inactivé, au moins partiellement par les enzymes leucocytaires. Notre hypothèse est que l'inhibition de l'adhésion ou de l'activation des PNN pourrait prévenir la destruction du TFPI. Il a été rapporté que l'HNF inhibait la formation des NETs. Ainsi, la greffe d'HNF sur les membranes AN69ST pourrait être un moyen efficace de prévenir le phénomène de NETose, limitant ainsi l'accumulation des plaquettes et des globules rouges et la thrombogénicité. La séquence d'évènements cellulaires et moléculaires à la surface de la membrane pourrait être précisée par des protocoles expérimentaux utilisant des systèmes de chambre à flux couplés à un vidéomicroscope. Un scénario possible est que c'est l'interaction des PNN avec les plaquettes activées qui serait à l'origine de la formation des NETs. Nous avons observé que les plaquettes présentes à la membrane et en contact avec

les PNN étaient totalement dégranulées, suggérant une sécrétion complète et une activation plaquettaire intense. La libération de chémokines par les plaquettes pourrait favoriser à son tour le recrutement et l'adhésion leucocytaire.

Par ailleurs, il a été décrit que les NETs, constituant des surfaces chargées négativement, pouvaient contribuer à l'activation de FXII (121). Selon ces auteurs, le FXIIa interviendrait de façon indépendante du FXI et de la génération de thrombine, en régulant directement la structure de la fibrine. Les PNN adhérents pourraient favoriser la thrombogénicité de la membrane de dialyse, en mettant en jeu des protéases activatrices des mécanismes hémostatiques.

Nos observations nous ayant montré l'importance de l'accumulation des PNN sur la membrane d'hémodialyse associée à une forte expression de FT, nous avons souhaité documenter l'expression de FT par les PNN. Nous avons rappelé en introduction les débats et données contradictoires concernant cette capacité d'expression du FT par les PNN. Les résultats que nous avons obtenus à partir de PNN provenant de sujets sains démontrent la capacité d'expression de FT après stimulation par l'IL-8 et le TNF. Nous avons montré que l'activation par le TNF impliquait les voies de signalisation intracellulaire ERK, MAPK p38 ainsi que les radicaux libres dérivés de l'oxygène. Nous observons également que l'adhésion des PNN favorise cette expression après activation par le TNF, et ce de façon dépendante des  $\beta 2$  intégrines. Les  $\beta 2$  intégrines pourraient donc favoriser l'expression de FT par une voie *outside-in* en synergie avec les voies mises en jeu par le TNF. En effet, le manganèse, activant les intégrines, n'est pas capable à lui seul de déclencher l'expression de FT. Ces intégrines leucocytaires ont, par ailleurs, la capacité de lier différents substrats tels que le fibrinogène et le C3b, ce qui pourrait favoriser l'adhésion des PNN à la membrane d'hémodialyse, lors des passages répétés du sang dans le dialyseur. Le facteur X est également un des ligands de CD11b. Il a été démontré au niveau du monocyte, et dans un modèle de circulation extracorporelle que cette interaction favorisait l'activation du facteur X (270). En effet, il a été rapporté que le CD11b était capable de se lier au FX ; cela induit la libération de cathepsine G par les monocytes. La protéase active alors le facteur X en présence de  $Ca^{2+}$  par clivage au niveau d'un site différent de celui reconnu par le complexe FT-FVIIa (271).

Un des arguments forts en faveur de l'expression du FT par le PNN nous a été apporté par l'étude de PNN provenant de patients insuffisants rénaux, traités par dialyse péritonéale, et présentant une péritonite. Les PNN étaient obtenus à partir du liquide péritonéal, puis purifiés



par un système immuno-magnétique. Ces PNN exprimaient très fortement le FT. La présence de PNN dans la cavité péritonéale est la conséquence d'une migration des PNN. Le contexte de cette migration suggère un environnement très inflammatoire. Ainsi, ce modèle nous semble très proche des conditions choisies pour l'expérimentation *in vitro*, à savoir l'utilisation des cytokines IL-8 et TNF. Nous n'avons pas étudié l'expression de FT par les PNN provenant du sang périphérique chez ces patients. De même, nous n'avons pas comparé directement l'expression de FT par les PNN, en réponse aux cytokines, chez l'insuffisant rénal, par rapport aux sujets sains. Néanmoins, nous avons observé la présence de FT dans les cellules sanguines circulantes avant hémodialyse (de l'ordre de 200 ng/g de protéines présentes dans les lysats cellulaires). En effet, il a été décrit que le niveau de FT était plus élevé dans les leucocytes de patients insuffisants rénaux chronique (IRC), par rapport aux leucocytes provenant de témoin sains et ce, avant le début des séances d'hémodialyse (2). Le niveau maximal de l'expression de FT par les leucocytes circulants (PNN et monocytes) a été observé à 30 minutes après le début de l'hémodialyse ; la membrane utilisée était en polysulfone. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'élévation d'expression du FT par ces cellules circulantes est transitoire, puisqu'elle diminue au bout de 120 minutes. En accord avec ces données, nos observations montrent que les cellules séquestrées dans le dialyseur expriment le FT. Une hypothèse possible afin d'expliquer la diminution de l'expression de FT par les cellules circulantes, au bout de 120 minutes, pourrait être que ces cellules ont été captées par la membrane.

Les patients porteurs d'IRC ont des niveaux de cytokines plus élevés que les témoins sains (272) ; cette élévation des cytokines semble être liée à l'accumulation de toxines urémiques et au contact des leucocytes avec les surfaces étrangères, au cours de l'hémodialyse. Plusieurs cytokines et chimiokines augmentent significativement au cours de l'hémodialyse, parmi lesquelles le TNF $\alpha$  et l'IL-8. Nos résultats *in vitro* montrent que ces deux cytokines favorisent l'expression de FT. De plus, il a été décrit que ces 2 cytokines étaient inductrices du phénomène de NETose par les PNN.

Une surproduction de formes réactives de l'oxygène a été observée au cours de l'hémodialyse. Les PNN de sujets urémiques se trouvent dans un état de pré-activation, responsable d'une explosion respiratoire déclenchée par une très faible stimulation. Par ailleurs, il a été décrit que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le HOCl étaient de puissants inducteurs du phénomène de NETose.

Cela suggère que les facteurs libérés au cours de l'hémodialyse, mais également les forces de cisaillement et la température de dialysat (37°C) créent un environnement très favorable à

l'activation des cellules et dont l'intensité pourrait aller jusqu'à la libération des NETs par les PNN.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons évalué l'effet du FVIIai dans un modèle d'hémodialyse, chez la brebis. La bonne tolérance du FVIIai, ainsi que l'absence d'effet sur les tests globaux d'exploration de la coagulation (TCA, TQ) en font un outil possible pour l'anticoagulation en hémodialyse. L'utilisation de FVIIai ou d'un inhibiteur du FT, soit en administration par bolus avant hémodialyse, soit en greffant la molécule inhibitrice sur la membrane, pourrait s'avérer intéressante chez les patients à très haut risque hémorragique. Le schéma présenté ci-dessous résume les différentes étapes qui semblent impliquées et sont potentiellement modulables (Figure 27).

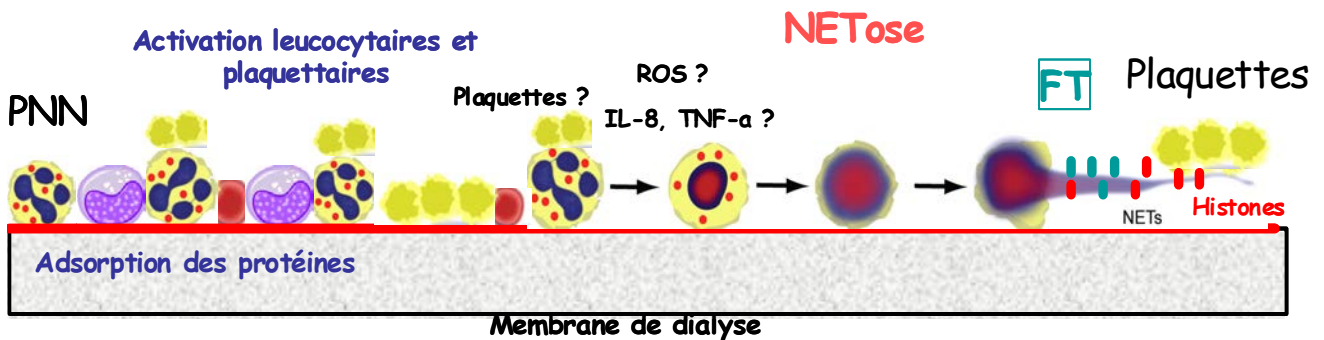


Figure 27 : Séquence proposée aboutissant à l'accumulation de FT sur la membrane d'hémodialyse

CONSLUSIONS /  
PERSPECTIVES

## 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail, mené dans le cadre d'un contrat CIFRE avec la société HOSPAL, nous a permis de mettre en évidence l'importance du phénomène d'adhésion leucocytaire et de l'expression du FT sur la membrane d'hémodialyse. Nous apportons de nouveaux arguments montrant la capacité des PNN à exprimer le FT. Un modèle ovin d'hémodialyse suggère l'intérêt d'une molécule telle que le FVIIai dans l'hémodialyse du patient à très haut risque hémorragique voire thrombotique.

En perspective de ce travail, il serait intéressant de phénotyper les patients hémodialisés ou candidats à l'hémodialyse et de dégager de ces profils biologiques, des marqueurs prédictifs du risque de thrombose lors de l'hémodialyse. Parmi ces biomarqueurs potentiels, nos résultats indiquent l'intérêt d'étudier la leucocytose sanguine, les variations de TFPI, les marqueurs d'activation des PNN, notamment les NETs.

S'il est difficile d'envisager à large échelle un produit tel que le FVIIai, ne serait-ce que pour une question économique, nos résultats montrent l'intérêt de cette molécule, dans les situations à fort risque hémorragique. L'inhibition de la voie du FT et la modulation des cytokines proinflammatoires pourraient également être bénéfiques à moyen et long terme, dans la mesure où ces molécules jouent un rôle déterminant dans la physiopathogénie des accidents vasculaires artériels, notamment coronaires. En effet, l'incidence des événements cardiovasculaires est élevée chez les patients hémodialisés dans des conditions conventionnelles d'anticoagulation.

D'autres molécules, ciblant la voie du FT ou l'activation des PNN ou encore les interactions cellulaires pourraient être évalués, soit en bolus, soit en les greffant sur les membranes. Parmi ces molécules, des inhibiteurs spécifiques du facteur Xa pourraient être utilisés. En effet, dans le travail que nous avons publié dans JTT en 2011 (273) nous montrions que le fondaparinux avait des propriétés intéressantes dans l'inhibition de l'expression de FT par le monocyte et dans la génération de thrombine induite par le monocyte activé. Ce travail montrait de façon originale l'effet synergique de l'IL-10 et du fondaparinux sur la génération de thrombine. Dans un travail conduit par le Dr Wynckel, au CHU de Reims, il a été montré que le fondaparinux était utilisable pour réaliser des séances d'hémodialyse, chez une patiente ayant

développé une thrombopénie induite par l'héparine (TIH). En dehors de ces situations exceptionnelles, la place du fondaparinux chez les sujets insuffisants rénaux doit être envisagée avec circonspection. En revanche, l'inhibition du FXa au niveau des membranes d'hémodialyse ou par voie systémique par des molécules peu ou non éliminées par le rein pourrait être une alternative à l'utilisation du FVIIai.

Ce travail nous a permis de nous interroger sur le modèle ovin, apparaissant comme un modèle animal de choix pour l'hémodialyse, mais présentant des différences notables avec l'Homme, notamment sur la voie extrinsèque, et que nous aimerions approfondir.

Notre travail n'a pas abordé la thrombogénicité de l'ensemble du circuit d'hémodialyse. Il serait, en effet, intéressant d'évaluer l'effet du flux, les phénomènes d'activation de la coagulation aux bifurcations voire au niveau des abords vasculaires. A ce titre, le facteur von Willebrand, souvent très élevé chez les patients insuffisants rénaux hémodialysés, pourrait jouer un rôle essentiel, en fonction des conditions de cisaillement tout au long du circuit.

Le modèle d'inhibition de la voie extrinsèque dépendant de l'activation des PNN pourrait s'appliquer à d'autres modèles d'hémocompatibilité et de circulation extracorporelle. Par ailleurs, à partir du modèle péritonéal, nous nous sommes interrogés sur l'importance de la génération de thrombine extravasculaire dans la physiopathologie des péritonites notamment de la péritonite sclérosante, qui pourrait être l'indication d'un traitement anticoagulant local.

# RESUME

## **RESUME:**

L'hémodialyse est le traitement de référence de l'insuffisance rénale chronique. L'anticoagulation du circuit extracorporel par l'héparine non fractionnée (HNF) a constitué une étape décisive dans le développement de cette technique. Actuellement, l'enjeu médical est d'améliorer l'hémocompatibilité des membranes et de limiter l'anticoagulation des circuits extracorporels. Il est généralement admis que la coagulation des circuits d'hémodialyse est la conséquence d'une mise en jeu du système contact (voie dite « intrinsèque » de la coagulation). L'objectif de ce travail est d'évaluer le rôle du facteur tissulaire (FT) dans l'initiation de la coagulation d'un circuit d'hémodialyse. Le FT est, en effet, le seul initiateur physiologique de la coagulation sanguine.

A partir de l'analyse des membranes d'hémodialyse, nous avons observé que les leucocytes et, majoritairement les polynucléaires neutrophiles (PNN) adhéraient aux membranes hémocompatibles (de type AN69ST). Ces cellules expriment un FT fonctionnel. Nous avons développé différents modèles d'étude de l'expression du FT par les PNN.

A partir de PNN humains obtenus chez des sujets sains, nous montrons que les PNN expriment le FT après stimulation par le TNF. L'IL-8, chemokine chimioattractante des PNN, augmente, par un effet de *priming*, l'expression de FT en réponse au TNF. L'inhibition de l'adhésion par un anticorps dirigé contre les  $\beta$ 2-intégrines, induit une diminution de l'expression de FT en réponse au TNF. L'inhibition de la voie de signalisation MEK1/2, la p38 MAPK, et des radicaux libres oxygénés, inhibe également cette expression.

A partir de PNN provenant de péritonites, secondaire à une dialyse péritonéale, nous avons mis en évidence une forte expression de FT par ces PNN (ARNm et protéine). Des tests fonctionnels (génération de Xa et analyse cinétique de la génération de thrombine par thrombinographie) indiquent le fort potentiel pro-coagulant de ces cellules. Ce modèle physiopathologique est la conséquence d'une migration et d'une activation inflammatoire comparable au modèle que nous avons développé *in vitro*.

L'ensemble de ces résultats indiquent que le FT véhiculé par les PNN est une cible potentielle d'anticoagulation des circuits d'hémodialyse. Dans l'objectif de faire la preuve de ce nouveau concept, nous avons évalué un facteur VII humain recombinant inactivé (FVIIai) dans un modèle d'hémodialyse chez le mouton. Nos résultats sont en faveur d'un effet anticoagulant du circuit d'hémodialyse, sans effet anticoagulant mesurable chez l'animal.

**Mots clés :** Hémodialyse, Facteur Tissulaire, Neutrophiles, Anticoagulation, Biocompatibilité.

## **ABSTRACT:**

Haemodialysis is the recognized standard treatment for patients with chronic kidney disease. Extracorporeal circuit anticoagulation by unfractionated heparin (UFH) has represented a major step in the development of this technique. Today, it is becoming a major medical issue to improve haemocompatibility and reduce bleeding risk in limiting anticoagulation. It is generally admitted that clotting of extracorporeal circuit is the result of contact-triggered thrombin generation (as the result of the so called "intrinsic pathway"). The objective of this study is to analyse the role of Tissue Factor, the unique physiological trigger on thrombin generation.

Analysing haemodialysis membranes, we found that leukocytes, mainly polymorphonuclear neutrophils (PMN) adhere to hemocompatible (AN69ST) membranes. These cells express a functional TF.

We next showed that human PMN obtained from healthy subjects expressed TF in response to TNF. IL-8, a major chemokine involved in PMN chemoattraction, primed TNF-induced TF by PMN. TF expression was down regulated when  $\beta 2$  integrins were blocked by a potent antibody. The inhibition of MEK1/2, p38 MAPK and free radicals reduced TF expression.

We observed, that PMN obtained from patients experiencing peritonitis, expressed high levels of TF (mRNA and protein). Functional assays measuring Xa generation and kinetics of thrombin generation (thrombinography) indicate the strong procoagulant potential of these cells. This physiopathological model is close to our *in vitro* model as it results from PMN migration and inflammatory activation.

These results indicate that PMN-borne TF is a potential target for haemodialysis circuit anticoagulation. For proof of concept, we evaluated the effect of an inactivated human recombinant factor VIIa (FVIIa) in a sheep model of hemodialysis. Our results show that FVIIa limits haemodialysis circuit coagulation without any measurable systemic anticoagulant effect.

**Keywords:** Haemodialysis, Tissue Factor, Neutrophils, Anticoagulation, Biocompatibility.



# ANNEXES

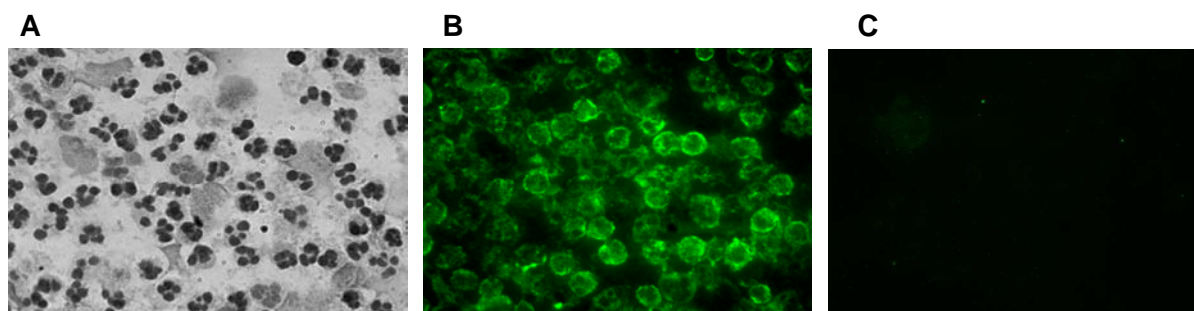
## IV. ANNEXES

### IV.1: Résultats complémentaires

Résultats complémentaires correspondant à l'article intitulé « Tissue factor expressed by adherent cells contributes to hemodialysis-membrane thrombogenicity » (Soumis à *Kidney International*)

#### 1. Expression du FT par les PNN humains activés :

Afin de visualiser l'expression de la protéine FT par les PNN, nous avons analysé, par microscopie à fluorescence, des PNN isolés à partir de témoins sains, après stimulation par IL-8 (500ng/mL) + TNF (100ng/mL). (Figure 1). La microscopie à fluorescence a confirmé la présence du FT dans le PNN et sa localisation, principalement membranaire.



**Figure 1:** A: PNN visualisées par microscopie à lumière transmise (B): par microscopie à fluorescence : marquage avec l'anticorps anti FT (4509) et C: IgG1 isotype Control.

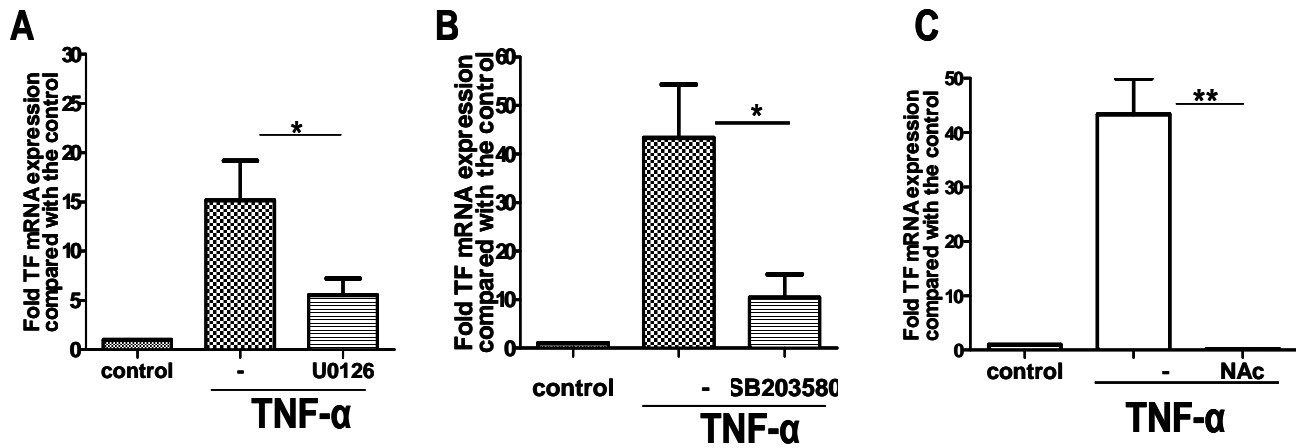
#### 2. Voies de signalisation impliquées dans l'expression de FT par le PNN, en réponse au TNF.

Des PNN humains purifiés ont été activés par le TNF (100 ng/mL) Au préalable, les PNN avaient été traités avec un inhibiteur hautement sélectif de MEK1/2: U0126 (Figure 2A). U0126 inhibe fortement l'expression de FT (ARNm) en réponse au TNF Ces résultats indiquent l'implication de la voie MEK1/2.

Nous avons ensuite examiné l'effet du SB203580, inhibiteur de p38- MAPK (Figure 2B). SB203580 inhibe l'expression du FT. Ces résultats démontrent que la p38 est directement impliquée.

Pour déterminer si les radicaux libres jouent un rôle dans l'expression de FT induite par le

TNF- $\alpha$  dans les PNN. Nous avons utilisé le NAc, piègeur de radicaux libres (Figure 2C). Le NAc inhibe complètement l'expression de FT par les PNN activés.



**Figure 2:** Expression du FT (ARNm) par les PNN humains (témoins sains) stimulés par le TNF (100 ng/ml) pendant 2 heures. (A) Effet de U0126:inhibiteur de MEK1 / 2 (B) Effet de SB203580: inhibiteur de la p-38 (C) effet du NAc (20 mM) (6 expériences indépendantes, \*\*  $p < 0,01$ ).

**IV.2: Article 3: IL-10 modulates fondaparinux inhibition of monocyte-induced thrombin generation**

## IL-10 modulates fondaparinux inhibition of monocyte-induced thrombin generation

Sonia Ben-Hadj-Khalifa · Nathalie Hézard · Wassim Y. Almawi · Souad Lakbakbi · Catherine Macé · Pascale Cornillet-Lefebvre · Touhami Mahjoub · Philippe Nguyen

Published online: 2 July 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** In addition to its established immuno-regulating capacity, the anti-inflammatory cytokine interleukin (IL)-10 exerts direct effects on coagulation. IL-10 down regulates the expression of tissue factor (TF) and thrombin generation (TG). Thus, we hypothesised that IL-10 could enhance the effect of anticoagulants. To evaluate in vitro the potential additive effect of IL-10 on fondaparinux-induced anticoagulation. Human monocytes were purified by elutriation, and were activated by factor Xa (FXa). Real-time RT-PCR and Western blotting were used to evaluate FXa-induced TF synthesis. TG test was used as a functional test to assess TF-dependent monocyte procoagulation, and to evaluate the effects of IL-10 (200 and 500 pg/ml) and fondaparinux (0.0, 0.1, 0.4, 0.7 and 1.2 µg/ml), separately and in combination. We confirmed that FXa induced TF mRNA and protein synthesis by monocyte in a concentration dependent manner. We showed that FXa-activated monocytes triggered TG via TF expression. We reported that IL-10 inhibited TG with a marginal effect

seen at 200 pg/ml. Results with fondaparinux showed a concentration-dependent TG inhibition. The combination of IL-10 and fondaparinux effects demonstrated that IL-10: (i) potentiates the inhibitory effect of fondaparinux on TG by 10–30%, and (ii) dramatically modifies fondaparinux IC50 for each TG parameter. IL-10 enhances in vitro the extent of anticoagulation induced by fondaparinux.

**Keywords** Fondaparinux · Interleukin-10 · Monocyte · Thrombin generation

### Introduction

In comparison with heparins, new anticoagulant molecules are nowadays selectively directed either against thrombin or factor Xa (FXa). Selective anti-Xa, including fondaparinux, are strongly effective antithrombotic drugs. They are reported to inhibit thrombin formation either directly or via antithrombin [1, 2]. Anti-Xa may also modulate thrombin generation (TG) triggering: indeed, a single publication mentions that FXa induces tissue factor (TF) expression [3]. Anti-Xa molecules may therefore limit TF expression. Among TF expression modulators, interleukin- (IL-) 10 is a well recognized down regulator of TF expression [4, 5]. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine produced by a variety of cells including lymphocytes, monocytes, and macrophages [6].

In addition to its long-established anti-inflammatory effects [7–16], IL-10 seems to influence coagulation. Indeed, IL-10 is well recognized to down regulate TF expression at the surface of monocytes [4, 5]. We recently reported that IL-10 could decrease TF-positive microparticle generation [17]. We also observed that IL-10 modulates the kinetics of TG and reduces the amount of

---

S. Ben-Hadj-Khalifa · T. Mahjoub  
Faculté de Pharmacie, Unité de Recherche des Maladies  
Hématologiques et Auto-Immunes, Monastir, Tunisie

S. Ben-Hadj-Khalifa · N. Hézard (✉) · S. Lakbakbi ·  
C. Macé · P. Cornillet-Lefebvre · P. Nguyen  
Laboratoire d'Hématologie, CHU Robert Debré,  
51092 Reims Cedex, France  
e-mail: nhezard@chu-reims.fr

N. Hézard · S. Lakbakbi · P. Cornillet-Lefebvre · P. Nguyen  
Faculté de Médecine, Université Reims-Champagne Ardenne,  
EA-3801, Reims Cedex, France

W. Y. Almawi  
College of Medicine and Medical Sciences,  
Arabian Gulf. University, Manama, Bahrain

generated thrombin [4]. This is on line with a publication showing that IL-10 results in a decrease of plasma levels of prothrombin fragment F1.2 and thrombin–antithrombin complexes [18].

These observations prompted us to hypothesize that (1) fondaparinux may modulate Xa-induced TF expression, and (2) IL-10 may synergize fondaparinux in a model of monocyte supported TG.

## Methods

### Platelet poor plasma preparation

Venous blood samples were obtained from five healthy volunteers (two men and three women; mean age  $27 \pm 4$  years), and informed consent was obtained from each participant. Volunteers were laboratory staff members, and did not receive any medication for the previous 2 weeks. Blood was withdrawn by antecubital venipuncture into Monovette<sup>®</sup> tubes (0.106 M citrate, BD, Franklin Lakes, NJ). A three-step centrifugation procedure comprising 10 min at 190 g, 10 min at 1,750 g, and 30 min at 13,000 g, was used. Platelet poor plasma (PPP) supernatants were pooled, stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , and were thawed for 5 min at  $37^{\circ}\text{C}$  immediately before use.

### Monocyte purification

Cytapheresis material was obtained from four healthy volunteers admitted for platelet donation in the blood transfusion unit of CHU Robert Debré (Paris, France). Informed consent was obtained from each participant. Human monocytes were purified from cytappheresis material by elutriation, as previously described [19]. Monocyte purity was assessed by CD14 staining of isolated cells (>95% CD14-positive), and cell viability (>98%) was determined by the trypan blue exclusion principle.

### Monocyte activation

Purified monocytes were washed in RPMI-1640 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise Cedex, France), and then adjusted to  $5.0 \times 10^6$  cells/ml in RPMI-1640.

Monocytes were then activated by incubation with FXa (from Stachrom heparin kit<sup>®</sup>, Diagnostica Stago, France) at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  humidified atmosphere. FXa was tested at 1 and 2 U/ml concentrations, and monocytes were incubated for 3 h (real-time RT-PCR) or 5 h (Western blotting and TG test). Supernatants were removed by centrifugation for 5 min at 400 g, and the pellet was washed with PBS (BioMérieux, France) and were either resuspended in 150  $\mu\text{l}$  PBS (TG test), or stored as dry

pellets at  $-80^{\circ}\text{C}$  (real-time RT-PCR and Western blotting). In parallel, monocytes were stimulated by 10 ng/ml LPS (*Escherichia coli* serotype O55:B5; Sigma, France). The procedure was similar to the experiment with FXa. The level of endotoxin in the FXa solution was determined by ELISA, as per manufacturer's specifications (Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic-QCL<sup>®</sup>; Lonza, France). FXa solution was found to be endotoxine-free.

The reversibility of Xa-induced monocyte activation was assessed using Fondaparinux. Fondaparinux and anti-thrombin (AT) were mixed at equimolar concentrations (2.5 and 4.5  $\mu\text{M}$ ) and incubated for 20 min at  $37^{\circ}\text{C}$  with FXa before its use for monocyte activation.

Evaluation of the IL-10 effect was assessed by pre-incubating monocytes for 2 h with recombinated human IL-10 (rhIL-10; R&D Systems, France) at 200 and 500 pg/ml, prior to activation with FXa. The baseline conditions corresponded to monocytes pre-incubated for 2 h with RPMI only.

### RNA extraction and real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from monocytes ( $5.0 \times 10^6$  cells) using RNeasy Mini-Kit<sup>™</sup> (Qiagen, France). Total cellular RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was used for cDNA synthesis using the iScript cDNA synthesis kit (Biorad, France). The cDNAs were then subjected to real-time RT-PCR analysis with Sybr Green PCR core reagents, as previously described [4]. Forward and reverse oligonucleotide primers were as follows:

$\beta 2$ -microglobulin, forward 5'-CCC CCA CTG AAA AAG ATG AG-3', reverse, 5'-TCA TCC AAT CCA AAT GCG GC-3'; TF: (forward) 5'-CCG ACG AGA TTG TGA AGG ATG T-3', (reverse) 5'-AGA GGC TCC CCA GCA GAA C-3'. Data were analyzed with the 7000 System SDS software. The transcript for the constitutive gene product  $\beta 2$ -microglobulin was used for data normalization.

### Protein extraction and Western blotting

Activated monocytes (dried pellet of  $5.0 \times 10^6$  cells) were lysed in RIPA buffer (1% igepal, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), in the presence of protease inhibitors (Protease Inhibitors Cocktail Complete<sup>®</sup>, Roche, France). The protein concentrations were determined by the Bradford kit (Biorad, France). Protein samples (10  $\mu\text{g}$ ) were subjected to 10% SDS-PAGE followed by a transfer to a PDVF membrane (Immune-Blot<sup>™</sup> PVDF; Biorad, France), an incubation overnight with mouse anti-human TF antibody (4509; American Diagnostica, France) and then for 1 h with horseradish peroxidase (HRP)-coupled goat-anti-mouse secondary antibody (IM0817; Beckman Coulter, France), and subsequent chemiluminescent detection using

ECL Plus™ Western blotting detection kit (Amersham, France). The TF signal was identified using pre-stained molecular mass protein ladder (Euromedex, France).

#### Fluorogenic measurement of thrombin generation

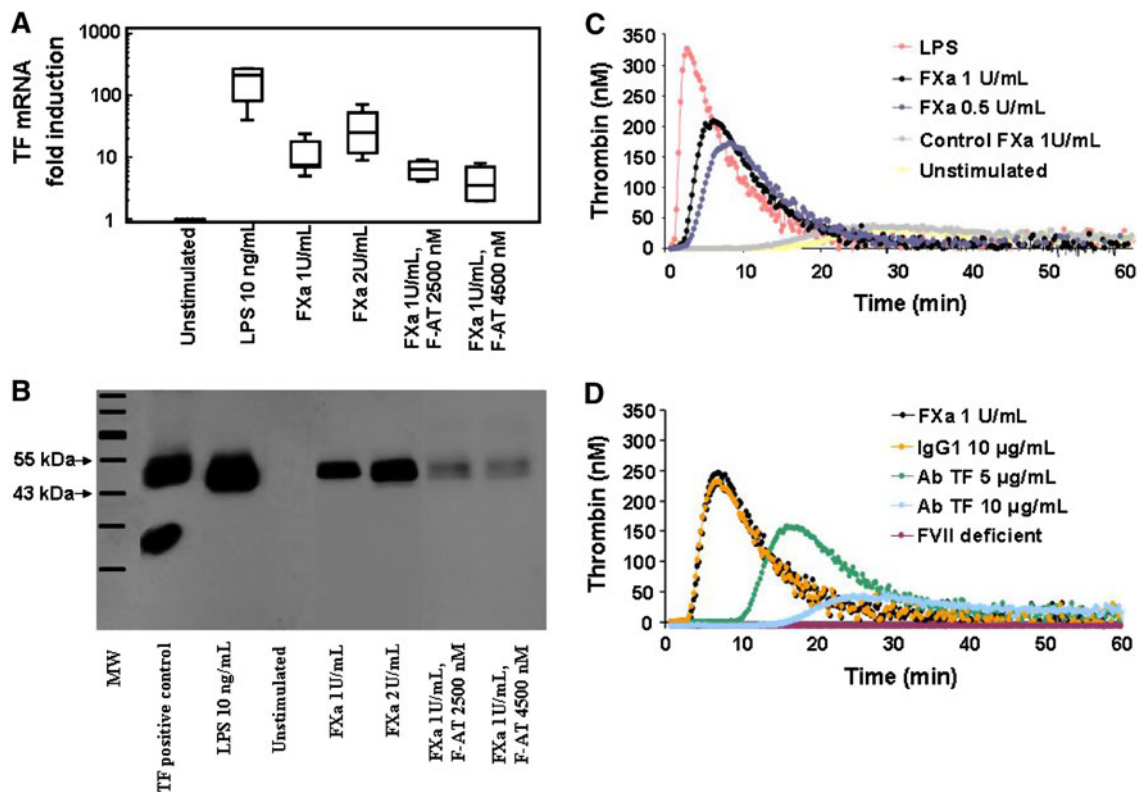
TG test was performed as previously described [20]. PPP was systematically used, and was supplemented with aprotinin (Sigma, France) at 200 kallikrein inhibitory units (KUI)/ml. For some experiments, PPP was spiked with increasing concentrations of fondaparinux (0.0, 0.1, 0.4, 0.7 and 1.2 µg/ml final concentrations). Activated monocytes (20 µl;  $0.4 \times 10^6$  cells) were added to 80 µl of PPP. The fluorogenic substrate, Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem, Switzerland) was added, and fluorometric determination of TG was performed using Fluoroskan® Ascent plate reader (ThermoLabsystems, Finland). Thrombinoscope™ software (Synapse BV, The Netherlands) was used to calculate TG. The parameters of the TG curve analyzed were: (a) lag-time (min), (b) thrombin peak (peak, nM), (c) endogenous thrombin potential (ETP, nM·min), and (d) rate index of propagation phase

calculated by the formula  $\text{peak}/(\text{time to peak} - \text{lag-time}; \text{rate index, nM/min})$ .

#### Results

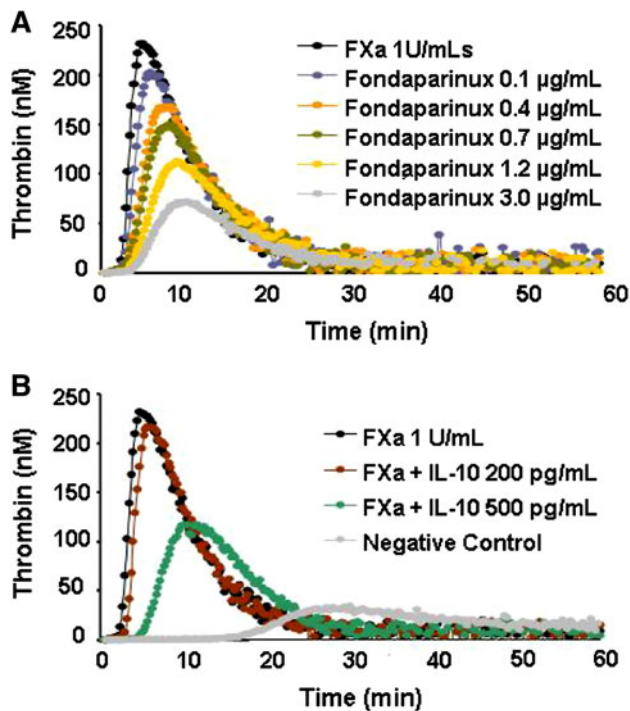
##### Induction of monocyte tissue factor expression by FXa and modulation by fondaparinux

As FXa was reported to induce TF expression, we first analyzed this effect in our model. The induction of TF expression in response to FXa was assessed by RT-PCR, Western blot analysis, and TG test. FXa induced TF mRNA (Fig. 1a), protein (Fig. 1b) synthesis in a dose-dependent manner, as revealed by RT-PCR and Western blot analysis, respectively. FXa-induced TF expression was antagonized by fondaparinux in the presence of anti-thrombin and in a dose dependent manner (Fig. 1a, b). TG test, used as a functional assay, showed that FXa-activated monocytes supported TG in a FXa dose dependent manner. The generation of thrombin was mediated by TF as



**Fig. 1** Induction of monocyte tissue factor (TF) expression by FXa. **a** Fold induction of TF mRNA quantified using real time RT-PCR; *Box plots* were obtained from 4 experiments. **b** TF protein synthesis evaluated by Western blot. TF positive control was a mix of Thromborel® (45 kD, glycosylated TF) and Innovin® (34 kD,

recombinant non glycosylated TF). **c** Thrombin generation (TG) induced by  $0.4 \times 10^6$  FXa-activated monocytes. **d** Effect of anti-TF antibodies (TF Ab), and FVII-deficient plasma on TG triggered by  $0.4 \times 10^6$  FXa activated monocytes. MW molecular weight marker, F fondaparinux, AT antithrombin



**Fig. 2** Inhibition of thrombin generation (TG) by fondaparinux or IL-10. **a** Effect of increasing concentrations of fondaparinux (0, 0.1, 0.4, 0.7, 1.2 µg/ml) on TG induced by  $0.4 \times 10^6$  activated monocytes (Fondaparinux was added in PPP when performing TG test. Monocytes were activated by 5 h incubation with 1 U/ml FXa). **b** Effect of increasing concentrations of IL-10 (0, 200, 500 pg/ml) on TG induced by  $0.4 \times 10^6$  activated monocytes (IL-10 was pre-incubated 2 h with monocytes before cell activation. Monocytes were activated by 5 h incubation with 1 U/ml FXa). For negative control, monocytes were pre-incubated during 2 h with the highest tested concentration of IL-10 (500 pg/ml), then during 5 h in a FXa free RPMI. Representative thrombograms from 4 triplicates experiments

demonstrated by the complete inhibition of TG either when TF is blocked (Fig. 1c) or in the absence of FVII (Fig. 1d).

FXa at a concentration of 1 U/ml was sufficient to induce both TF synthesis and thrombin generation. This concentration was selected for subsequent experiments.

Effect of IL-10 on thrombin generation supported by FXa-activated monocytes

Monocytes were pre-incubated with IL-10 at 200 and 500 pg/ml, and stimulated with FXa. For the TG test, FXa-activated monocytes were mixed with PPP. Results from Fig. 2b showed that IL-10 inhibited TG in a concentration-dependent fashion, with a slight effect at 200 pg/ml, compared with the high inhibition observed at 500 pg/ml. The IL-10 concentration of 200 pg/ml was then chosen for subsequent functional assays that assess the combined effect of IL-10 and fondaparinux.

Effect of fondaparinux on thrombin generation supported by FXa-activated monocytes

Monocyte TF expression was elicited at FXa concentration of 1 U/ml. TG test was done using monocytes as the unique source of TF and phospholipids. PPP spiked with increasing concentrations of fondaparinux, ranging from 0.0 to 1.2 µg/ml, was added to monocytes. Results from Fig. 2a demonstrated a concentration-dependent inhibition of TG by fondaparinux. The most sensitive parameter was the rate index (maximal inhibition = 80%), followed by thrombin peak (maximal inhibition = 60%), and by ETP (maximal inhibition = 40%). The lag time was prolonged by 75% compared to baseline value (Table 1).

Effect of the combination of IL-10 and fondaparinux on thrombin generation supported by FXa-activated monocytes

To evaluate the potential modulation of fondaparinux anticoagulation by IL-10, monocytes were pre-incubated with IL-10 (200 pg/ml), activated by FXa (1 U/ml), and then mixed with PPP containing fondaparinux (at 0, 0.1, 0.4, 0.7, 1.2, 3.0 µg/ml final concentration). Results from

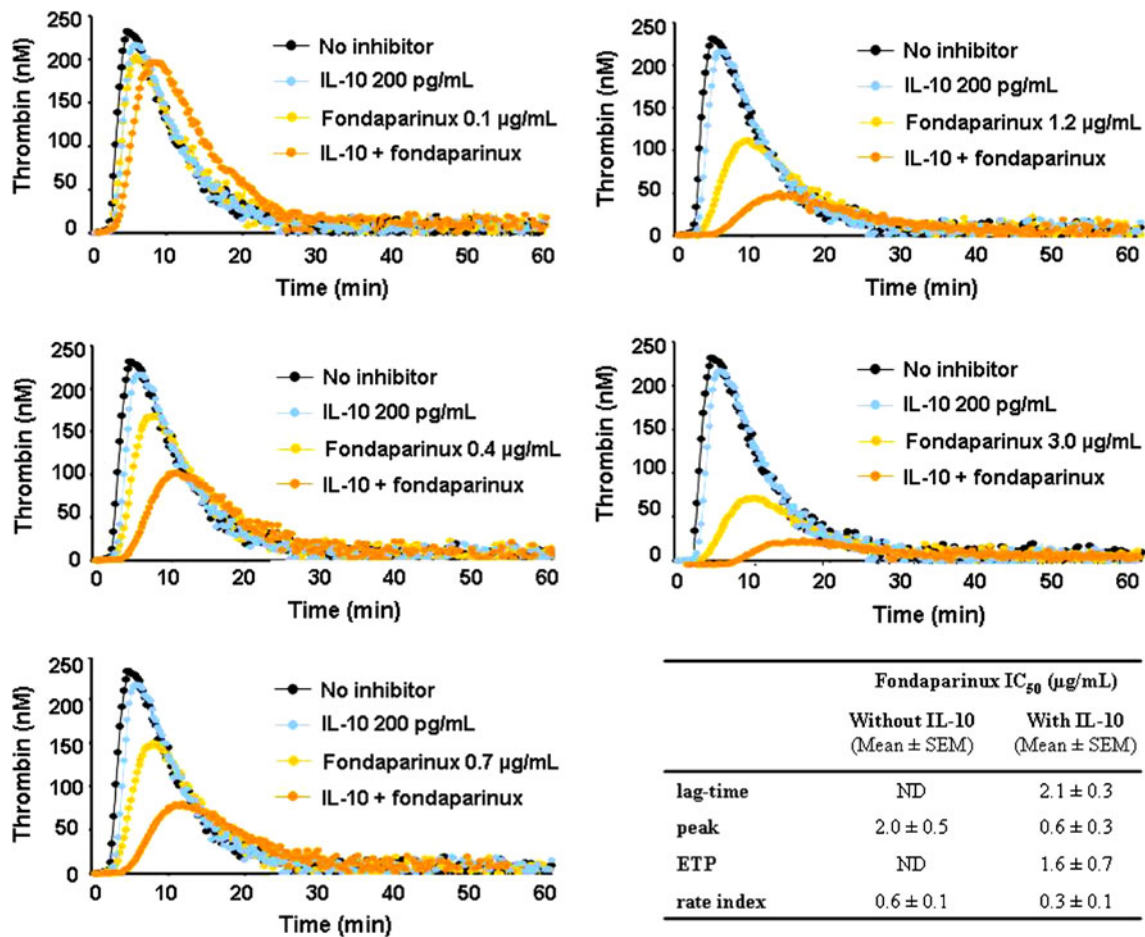
**Table 1** Effect of IL-10 at 200 pg/mL in addition to fondaparinux (TG test)

		Fondaparinux (µg/mL)					
		0.0	0.1	0.4	0.7	1.2	3.0
No IL-10	Lag-time (%)	100 ± 0	110 ± 2	135 ± 1	139 ± 2	161 ± 3	177 ± 10
	ETP (%)	100 ± 0	96 ± 2	92 ± 4	82 ± 3	79 ± 4	60 ± 6
	Peak (%)	100 ± 0	88 ± 2	76 ± 2	70 ± 4	58 ± 5	41 ± 5
	Rate index (%)	100 ± 0	81 ± 13	60 ± 9	54 ± 10	33 ± 4	23 ± 5
IL-10 (200 pg/mL)	Lag-time (%)	100 ± 0	123 ± 1	150 ± 4	159 ± 1	174 ± 10	207 ± 4
	ETP (%)	100 ± 0	95 ± 4	78 ± 4	71 ± 10	55 ± 11	35 ± 11
	Peak (%)	100 ± 0	81 ± 8	57 ± 11	48 ± 11	37 ± 12	21 ± 7
	Rate index (%)	100 ± 0	61 ± 9	39 ± 9	30 ± 8	20 ± 7	10 ± 3

Data obtained in 3 experiments represented as means % ± SEM

TG thrombin generation, ETP endogenous thrombin potential





**Fig. 3** Effect of the combination of IL-10 and fondaparinux on thrombin generation supported by FXa-activated monocytes. Monocytes were pre-incubated or not with IL-10 (200 pg/ml), activated by FXa (1 U/ml) and then mixed with PPP containing fondaparinux. Representative thrombograms from 4 triplicate experiments at

increasing fondaparinux concentrations (0, 0.1, 0.4, 0.7, 1.2, 3.0 µg/ml). Table reports fondaparinux IC<sub>50</sub> calculated in the presence versus absence of IL-10 at 200 pg/ml. Means ± SEM were obtained from 4 triplicate experiments. *ND* not determined for tested fondaparinux concentrations

Fig. 3 showed that IL-10 potentiated the inhibitory effect of fondaparinux, which was observed at each fondaparinux concentration tested. For the same extent of TG inhibition, lower fondaparinux concentrations were needed in case of pre-incubation with IL-10, versus no IL-10 (Table 1).

IC<sub>50</sub> values were then calculated for each TG parameter. For peak, ETP and rate index, IC<sub>50</sub> was defined as the fondaparinux concentration that resulted in a 50% decrease in baseline value. For the lag-time, IC<sub>50</sub> was determined as the fondaparinux concentration resulting in doubling this parameter. In case of fondaparinux alone, fondaparinux IC<sub>50</sub> were not reached for lag-time and ETP parameters. IL-10 pre-incubation allowed: (1) reaching fondaparinux IC<sub>50</sub> for lag-time and ETP, and (2) minimizing fondaparinux IC<sub>50</sub> values for peak (threefolds) and rate index (twofolds) (Fig. 3).

**Discussion**

The first objective of our study was to evaluate whether a selective anti-Xa inhibitor could modulate Xa-induced TF expression. Our experiments clearly show that FXa induces TF expression by monocytes. This expression is down regulated by fondaparinux in the presence of antithrombin. One single study, using a human mononuclear cell preparation, reports this ability for FXa to induce monocyte TF expression [3]. Here, we ruled out any effect of cell–cell interactions by using a highly purified monocyte preparation and confirm that FXa induces monocyte TF mRNA expression as well as protein synthesis. We also clearly show that FXa-activated monocytes are able to support thrombin generation via the TF pathway.

The fact that FXa elicits TF expression indicates that a cell signalling is involved. Among potential receptors,

protease-activated receptors (PARs) may be good candidates. Indeed, it is known that monocytes express the four types of PARs [21, 22]. FXa is able to cleave PAR-1 and PAR-2 [23–27]. The involvement of PAR receptors in TF induction is plausible, since it was reported the ability of FXa to stimulate cytokine release by monocytes [28]. Here we show that fondaparinux counteracts the FXa inducer effect on TF expression.

The second objective was to evaluate whether IL-10 could synergize the effect of fondaparinux on TG. Indeed, in addition to its established immuno-regulating capacity, the anti-inflammatory cytokine IL-10 exerts direct effects on coagulation. We and others established that IL-10 is a potent inhibitor of TF expression by activated monocytes [4, 5]. We also demonstrated that IL-10 inhibits monocyte microvesiculation and TG supported by either intact stimulated monocytes or monocyte MPs [4, 16]. We recently reported that fondaparinux inhibits TG induced by both activated monocytes and monocyte microparticles [20]. We addressed separately the inhibitory effect of fondaparinux and IL-10. We showed that either fondaparinux or IL-10 can inhibit TG supported by FXa-activated monocytes in a concentration dependent manner. These results are in agreement with ones obtained in a LPS activated monocyte model [4, 20]. Here, FXa is the inducer of TF expression. At last, the combined effect of fondaparinux and IL-10 was examined in this TG model. To the best of our knowledge, this is the first report demonstrating a synergistic effect of fondaparinux and IL-10 on the inhibition of TG. Indeed, in the presence of IL-10 at 200 pg/ml, a too low concentration to significantly inhibit TG, we observed a clear decrease of fondaparinux IC50. The synergism between IL-10 and fondaparinux are likely to be explained by effects on at least two pathways. We suggest that IL-10 acts by affecting the monocyte membrane environment and then the availability of FXa to AT and to fondaparinux. We previously reported a differential inhibitory effect of fondaparinux according to the monocyte membrane environment [20]. Our finding brings a novel concept in which an anti-inflammatory cytokine may act in synergy with an anti-coagulant drug. The fact that IL-10 decreases fondaparinux IC50 suggests that a pre-treatment by IL-10 may allow to reduce the fondaparinux dose. This should be evaluated in animal models.

**Acknowledgment** The authors are grateful for the excellent laboratory assistance from Marie G. Remy and Bernadette Florent.

## References

- Bauer KA (2004) Fondaparinux: a new synthetic and selective inhibitor of factor Xa. *Best Pract Res Clin Haematol* 17:89–104
- Bauer KA (2006) New anticoagulants. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 1:450–456
- Akahane K, Okamoto K, Kikuchi M, Todoroki H, Higure A, Ohuchida T, Kitahara K, Takeda S, Itoh H, Ohsato K (2001) Inhibition of factor Xa suppresses the expression of tissue factor in human monocytes and lipopolysaccharide-induced endotoxemia in rats. *Surgery* 130:809–818
- Poitevin S, Cochery-Nouvellon E, Dupont A, Nguyen P (2007) Monocyte IL-10 produced in response to lipopolysaccharide modulates thrombin generation by inhibiting tissue factor expression and release of active tissue factor-bound microparticles. *Thromb Haemost* 97:598–607
- Kamimura M, Viedt C, Dalpke A, Rosenfeld ME, Mackman N, Cohen DM, Blessing E, Preusch M, Weber CM, Kreuzer J, Katus HA, Bea F (2005) Interleukin-10 suppresses tissue factor expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages via inhibition of Egr-1 and a serum response element/MEK-ERK1/2 pathway. *Circ Res* 97:305–313
- Lalani I, Bhol K, Ahmed AR (1997) Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79:469–483
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209–1220
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147:3815–3822
- Uyemura K, Demer LL, Castle SC, Jullien D, Berliner JA, Gately MK, Warriar RR, Pham N, Fogelman AM, Modlin RL (1996) Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest* 97:2130–2138
- Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C (1991) Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 174:1549–1555
- Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggin E, Lesèche G, Tedgui A (1999) Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerosis plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:611–616
- Song S, Ling-Hu H, Roebuck KA, Rabbi MF, Donnelly RP, Finnegan A (1997) Interleukin-10 inhibits interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 gene transcription in human monocytes. *Blood* 89:4461–4469
- de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel R, de Vries JE (1991) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174:915–924
- Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM (1995) IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 96:2304–2310
- Eslick J, Scatizzi JC, Albee L, Bickel E, Bradley K, Perlman H (2004) IL-4 and IL-10 inhibition of spontaneous monocyte apoptosis is associated with flip upregulation. *Inflammation* 28:139–145
- Poitevin S, Ben Hadj Kalifa Kechiche S, Macé C, Nguyen P (2009) IL-10 inhibits apoptosis and microvesiculation of human monocytes. *J Thromb Haemost* 7:1241–1243
- Eslick J, Scatizzi JC, Albee L, Bickel E, Bradley K, Perlman H (2004) IL-4 and IL-10 inhibition of spontaneous monocyte apoptosis is associated with flip upregulation. *Inflammation* 28:139–145

18. Pajkrt D, van der Poll T, Levi M, Cutler DL, Affrime MB, van den Ende A, ten Cate JW, van Deventer SJ (1997) Interleukin-10 inhibits activation of coagulation and fibrinolysis during human endotoxemia. *Blood* 89:2701–2705
19. Nguyen P, Broussas M, Cornillet-Lefebvre P, Potron G (1999) Coexpression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes purified by leukapheresis and elutriation. Response of nonadherent cells to lipopolysaccharide. *Transfusion* 39:975–982
20. Ben-Hadj-khalifa-Kechiche S, Hezard N, Poitevin S, Remy MG, Florent B, Mahjoub T, Nguyen P (2010) Differential inhibitory effect of fondaparinux on the procoagulant potential of intact monocytes and monocytederived microparticles. *J Thromb Thrombolysis* 4:412–418
20. Busch G, Seitz I, Steppich B, Hess S, Eckl R, Schömig A, Ott I (2005) Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes: implications in acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:461–466
21. López-Pedreira C, Aguirre MA, Buendía P, Barbarroja N, Ruiz-Limón P, Collantes-Estevez E, Velasco F, Khamashta M, Cuadrado MJ (2010) Differential expression of protease-activated receptors in monocytes from patients with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 62:869–877
22. Riewald M, Kravchenko VV, Petrovan RJ, O'Brien PJ, Brass LF, Ulevitch RJ, Ruf W (2001) Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood* 97:3109–3116
23. Camerer E, Kataoka H, Kahn M, Lease K, Coughlin SR (2002) Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 277:16081–16087
24. Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J (2006) Protease-activated receptor-2 is essential for factor VIIa and Xa-induced signaling, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res* 66:307–314
25. Ahamed J, Ruf W (2004) Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 279:23038–23044
26. Schuepbach RA, Riewald M (2010) Coagulation factor Xa cleaves protease-activated receptor-1 and mediates signalling dependent on binding to the endothelial protein C receptor. *J Thromb Haemost* 8:379–388
27. Bach R, Gentry R, Nemerson Y (1986) Factor VII binding to tissue factor in reconstituted phospholipid vesicles: induction of cooperativity by phosphatidylserine. *Biochemistry* 25:4007–4020

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Burman JF, Chung HI, Lane DA, Philippou H, Adami A, Lincoln JC. Role of factor XII in thrombin generation and fibrinolysis during cardiopulmonary bypass. *Lancet*. 1994 Oct 29;344(8931):1192-3.
2. Kourtzelis I, Markiewski MM, Doumas M, Rafail S, Kambas K, Mitroulis I, et al. Complement anaphylatoxin C5a contributes to hemodialysis-associated thrombosis. *Blood*. 2010 Jul 29;116(4):631-9.
3. Ben-Hadj-Khalifa S, Hezard N, Almawi WY, Lakbakbi S, Mace C, Cornillet-Lefebvre P, et al. IL-10 modulates fondaparinux inhibition of monocyte-induced thrombin generation. *J Thromb Thrombolysis*. 2011 Oct;32(3):311-7.
4. Peake JM. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc Immunol Rev*. 2002;8:49-100.
5. Seely AJ, Pascual JL, Christou NV. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care*. 2003 Aug;7(4):291-307.
6. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*. 2000 May;80(5):617-53.
7. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010 Nov 24;33(5):657-70.
8. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997 May 15;89(10):3503-21.
9. Chertov O, Yang D, Howard OM, Oppenheim JJ. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev*. 2000 Oct;177:68-78.
10. Faurischou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(14):1317-27.
11. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*. 2008;213(3-4):183-91.
12. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006 Mar;6(3):173-82.
13. Zarbock A, Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol*. 2008 Jan;172(1):1-7.

14. Malik AB, Lo SK. Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharmacol Rev.* 1996 Jun;48(2):213-29.
15. Williams MA, Solomkin JS. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J Leukoc Biol.* 1999 Jun;65(6):725-36.
16. Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol.* 1999 Nov;66(5):698-704.
17. Luscinskas FW, Gimbrone MA, Jr. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. *Annu Rev Med.* 1996;47:413-21.
18. Detmers PA, Zhou D, Polizzi E, Thieringer R, Hanlon WA, Vaidya S, et al. Role of stress-activated mitogen-activated protein kinase (p38) in beta 2-integrin-dependent neutrophil adhesion and the adhesion-dependent oxidative burst. *J Immunol.* 1998 Aug 15;161(4):1921-9.
19. Sengupta K, Aranda-Espinoza H, Smith L, Janmey P, Hammer D. Spreading of neutrophils: from activation to migration. *Biophys J.* 2006 Dec 15;91(12):4638-48.
20. Gougerot-Pocidallo MA, el Benna J, Elbim C, Chollet-Martin S, Dang MC. [Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines]. *J Soc Biol.* 2002;196(1):37-46.
21. Roos D, van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003 Nov;5(14):1307-15.
22. Mayer-Scholl A, Averhoff P, Zychlinsky A. How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol.* 2004 Feb;7(1):62-6.
23. Scapini P, Carletto A, Nardelli B, Calzetti F, Roschke V, Merigo F, et al. Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. *Blood.* 2005 Jan 15;105(2):830-7.
24. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 Sep;72(9):3666-70.
25. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004 Sep 15;18(18):2195-224.
26. Haefner B. NF-kappa B: arresting a major culprit in cancer. *Drug Discov Today.* 2002 Jun 15;7(12):653-63.

27. Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol Ser.* 1992;56:3-34.
28. van der Poll T, Calvano SE, Kumar A, Braxton CC, Coyle SM, Barbosa K, et al. Endotoxin induces downregulation of tumor necrosis factor receptors on circulating monocytes and granulocytes in humans. *Blood.* 1995 Oct 1;86(7):2754-9.
29. Paleolog EM, Delasalle SA, Buurman WA, Feldmann M. Functional activities of receptors for tumor necrosis factor-alpha on human vascular endothelial cells. *Blood.* 1994 Oct 15;84(8):2578-90.
30. Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science.* 1999 Jan 22;283(5401):543-6.
31. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, et al. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1996 Mar 1;271(9):4961-5.
32. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.* 1996 Jan 26;84(2):299-308.
33. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity.* 1998 Mar;8(3):297-303.
34. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.* 1996 Nov 1;87(3):565-76.
35. Holtmann MH, Schutz M, Galle PR, Neurath MF. Functional relevance of soluble TNF-alpha, transmembrane TNF-alpha and TNF-signal transduction in gastrointestinal diseases with special reference to inflammatory bowel diseases. *Z Gastroenterol.* 2002 Aug;40(8):587-600.
36. McCain RW, Dessypris EN, Christman JW. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates human polymorphonuclear leukocytes to produce interleukin-8 in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993 Jan;8(1):28-34.
37. Lindley I, Aschauer H, Seifert JM, Lam C, Brunowsky W, Kownatzki E, et al. Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil-activating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(23):9199-203.

38. De Rossi M, Bernasconi P, Baggi F, de Waal Malefyt R, Mantegazza R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int Immunol*. 2000 Sep;12(9):1329-35.
39. Gimbrone MA, Jr., Obin MS, Brock AF, Luis EA, Hass PE, Hebert CA, et al. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science*. 1989 Dec 22;246(4937):1601-3.
40. Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun*. 1993 Nov;61(11):4569-74.
41. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997 Aug 1;90(3):909-28.
42. Zhang W, Chen H. [The study on the interleukin-8 (IL-8)]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2002 Dec;19(4):697-702.
43. Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*. 1994 Nov;56(5):554-8.
44. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, et al. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1988 Jun 1;167(6):1883-93.
45. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*. 1989 Oct;84(4):1045-9.
46. Okamoto S, Nomura H, Matsushima K. [Function, molecular structure and gene expression of IL-8]. *Nihon Rinsho*. 1992 Aug;50(8):1816-20.
47. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*. 2001 Aug;250(2):91-104.
48. Atta ur R, Harvey K, Siddiqui RA. Interleukin-8: An autocrine inflammatory mediator. *Curr Pharm Des*. 1999 Apr;5(4):241-53.
49. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*. 1992 Jul 27;307(1):97-101.
50. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Vanden Bos T, Nelson N, Gearing DP, Beckmann MP. Molecular characterization of receptors for human interleukin-8, GRO/melanoma growth-stimulatory activity and neutrophil activating peptide-2. *Mol Immunol*. 1993 Mar;30(4):359-67.
51. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991 Sep 13;253(5025):1278-80.



52. Richardson RM, Ali H, Pridgen BC, Haribabu B, Snyderman R. Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A. Independent regulation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1998 Apr 24;273(17):10690-5.
53. Knall C, Worthen GS, Johnson GL. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 1;94(7):3052-7.
54. Knall C, Young S, Nick JA, Buhl AM, Worthen GS, Johnson GL. Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem.* 1996 Feb 2;271(5):2832-8.
55. MacManus CF, Pettigrew J, Seaton A, Wilson C, Maxwell PJ, Berlingeri S, et al. Interleukin-8 signaling promotes translational regulation of cyclin D in androgen-independent prostate cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2007 Jul;5(7):737-48.
56. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):6735-41.
57. Horne BD, Anderson JL, John JM, Weaver A, Bair TL, Jensen KR, et al. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *J Am Coll Cardiol.* 2005 May 17;45(10):1638-43.
58. Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol.* 2010 Mar;89(3):359-72.
59. Zerneck A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Nov;28(11):1897-908.
60. Trujillo-Santos J, Di Micco P, Iannuzzo M, Lecumberri R, Guijarro R, Madridano O, et al. Elevated white blood cell count and outcome in cancer patients with venous thromboembolism. Findings from the RIETE Registry. *Thromb Haemost.* 2008 Nov;100(5):905-11.
61. Fourrier F, Jourdain M, Tournois A, Caron C, Goudemand J, Chopin C. Coagulation inhibitor substitution during sepsis. *Intensive Care Med.* 1995 Nov;21 Suppl 2:S264-8.
62. Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials.* 2004 Nov;25(26):5681-703.
63. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):2311-5.

64. Imamura T, Kaneda H, S N. New functions of neutrophils in the arthus reaction: expression of tissue factor, the clotting initiator, and fibrinolysis by elastase. *Lab Invest.* 2002;82(10):1287-95.
65. Maugeri N, Brambilla M, Camera M, Carbone A, Tremoli E, Donati MB, et al. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost.* 2006 Jun;4(6):1323-30.
66. Ritis K, Doumas M, Mastellos D, Micheli A, Giaglis S, Magotti P, et al. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol.* 2006 Oct 1;177(7):4794-802.
67. Kambas K, Markiewski MM, Pneumatikos IA, Rafail SS, Theodorou V, Konstantonis D, et al. C5a and TNF-alpha up-regulate the expression of tissue factor in intra-alveolar neutrophils of patients with the acute respiratory distress syndrome. *J Immunol.* 2008 Jun 1;180(11):7368-75.
68. Todoroki H, Nakamura S, Higure A, Okamoto K, Takeda S, Nagata N, et al. Neutrophils express tissue factor in a monkey model of sepsis. *Surgery.* 2000 Feb;127(2):209-16.
69. Rafail S, Ritis K, Schaefer K, Kourtzelis I, Speletas M, Doumas M, et al. Leptin induces the expression of functional tissue factor in human neutrophils and peripheral blood mononuclear cells through JAK2-dependent mechanisms and TNFalpha involvement. *Thromb Res.* 2008;122(3):366-75.
70. Hair GA, Padula S, Zeff R, Schmeizl M, Contrino J, Kreutzer DL, et al. Tissue factor expression in human leukemic cells. *Leuk Res.* 1996 Jan;20(1):1-11.
71. Osterud B, Rao LV, Olsen JO. Induction of tissue factor expression in whole blood: lack of evidence for the presence of tissue factor expression in granulocytes. *Thromb Haemost.* 2000 Jun;83(6):861-7.
72. Nemerson Y. Tissue factor in neutrophils. *Thromb Haemost.* 2000 Jun;83(6):802.
73. de Waard V, Hansen HR, Spronk HH, Timmerman JJ, Pannekoek H, Florquin S, et al. Differential expression of tissue factor mRNA and protein expression in murine sepsis. The role of the granulocyte revisited. *Thromb Haemost.* 2006 Feb;95(2):348-53.
74. Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Osterud B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood.* 2008 Feb 1;111(3):1208-16.

75. Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frere C, Bonier R, Mackman N, et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood*. 2012 Sep 6;120(10):2133-43.
76. Hess C, Sadallah S, Hefti A, Landmann R, Schifferli JA. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol*. 1999 Oct 15;163(8):4564-73.
77. Sadallah S, Eken C, Schifferli JA. Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clin Exp Immunol*. 2010 Jan;163(1):26-32.
78. Sadallah S, Eken C, Schifferli JA. Ectosomes as immunomodulators. *Semin Immunopathol*. 2010 Sep;33(5):487-95.
79. Stein JM, Luzio JP. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J*. 1991 Mar 1;274 ( Pt 2):381-6.
80. Gasser O, Hess C, Miot S, Deon C, Sanchez JC, Schifferli JA. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res*. 2003 May 1;285(2):243-57.
81. Bazil V, Horejsi V. Shedding of the CD44 adhesion molecule from leukocytes induced by anti-CD44 monoclonal antibody simulating the effect of a natural receptor ligand. *J Immunol*. 1992 Aug 1;149(3):747-53.
82. Wright SD, Meyer BC. Phorbol esters cause sequential activation and deactivation of complement receptors on polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1986 Mar 1;136(5):1759-64.
83. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:767-804.
84. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. 1992 Apr 1;148(7):2207-16.
85. Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld JP, et al. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int*. 2006 Apr;69(8):1416-23.
86. Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, Apostolidou E, Skendros P, Girod A, et al. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis*. 2013 Jul 19.

87. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem*. 1999 Aug 13;274(33):23111-8.
88. 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.
89. Rohrbach AS, Slade DJ, Thompson PR, Mowen KA. Activation of PAD4 in NET formation. *Front Immunol*. 2012;3:360.
90. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Aug;5(8):577-82.
91. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007 Apr;13(4):463-9.
92. Hemmers S, Teijaro JR, Arandjelovic S, Mowen KA. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS One*. 2011;6(7):e22043.
93. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2010 Aug 30;207(9):1853-62.
94. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2009 Jan 26;184(2):205-13.
95. Abi Abdallah DS, Denkers EY. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *Front Immunol*. 2012;3:382.
96. Knight JS, Zhao W, Luo W, Subramanian V, O'Dell AA, Yalavarthi S, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *J Clin Invest*. 2013 Jul 1;123(7):2981-93.
97. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. Nov 2010 1;191(3):677-91.
98. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007 Jan 15;176(2):231-41.
99. Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T, Soma G. ROS and innate immunity. *Anticancer Res*. 2009 Mar;29(3):817-21.

100. Kirchner T, Moller S, Klinger M, Solbach W, Laskay T, Behnen M. The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm.* 2012;849136.
101. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 2010 Jan 20;117(3):953-9.
102. Palmer LJ, Cooper PR, Ling MR, Wright HJ, Huissoon A, Chapple IL. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin Exp Immunol.* 2012 Feb;167(2):261-8.
103. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol.* 2010 Feb;7(2):75-7.
104. Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010 Dec 15;185(12):7413-25.
105. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013 Sep 5.
106. Dyett DE, Malawista SE, Van Blaricom G, Melnick DA, Malech HL. Functional integrity of cytokineplasts: specific chemotactic and capping responses. *J Immunol.* 1985 Sep;135(3):2090-4.
107. Huang AJ, Silverstein SC, Malawista SE. Cryopreserved cytoplasts from human neutrophils migrate across monolayers of human endothelial cells in response to a chemoattractant gradient. *J Leukoc Biol.* 1991 Dec;50(6):624-7.
108. Berends ET, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Kockritz-Blickwede M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun.* 2010 2(6):576-86.
109. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood.* 2009 Sep 24;114(13):2619-22.
110. Bianchi M, Niemiec MJ, Siler U, Urban CF, Reichenbach J. Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 May;127(5):1243-52 e7.

111. Uchiyama S, Andreoni F, Schuepbach RA, Nizet V, Zinkernagel AS. DNase Sda1 allows invasive M1T1 Group A Streptococcus to prevent TLR9-dependent recognition. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002736.
112. Dworski R, Simon HU, Hoskins A, Yousefi S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 May;127(5):1260-6.
113. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2011 Jul 1;187(1):538-52.
114. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011 Mar 9;3(73):73ra20.
115. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2011 Jan;10(1):136-44.
116. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Sep 7;107(36):15880-5.
117. Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lammle B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood.* 2012 Aug 9;120(6):1157-64.
118. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 2010 Aug;16(8):887-96.
119. Doring Y, Manthey HD, Drechsler M, Lievens D, Megens RT, Soehnlein O, et al. Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation.* 2012 Apr 3;125(13):1673-83.
120. Megens RT, Vijayan S, Lievens D, Doring Y, van Zandvoort MA, Grommes J, et al. Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2012 Mar;107(3):597-8.
121. von Bruhl 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.

122. Konings J, Govers-Riemslog JW, Philippou H, Mutch NJ, Borissoff JI, Allan P, et al. Factor XIIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3942-51.
123. Longstaff C, Varju I, Sotonyi P, Szabo L, Krumrey M, Hoell A, et al. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem*. 2013 Mar 8;288(10):6946-56.
124. Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, Yang JJ, De Meyer SF, Kollnberger M, et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood*. 2010 Jan 27;117(4):1400-7.
125. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:217-46.
126. Pemberton AD, Brown JK, Inglis NF. Proteomic identification of interactions between histones and plasma proteins: implications for cytoprotection. *Proteomics*. 2010 Apr;10(7):1484-93.
127. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*. 2009 Nov;15(11):1318-21.
128. Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, Huyck J, Boettcher J, Rienstra CM, et al. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood*. 2010 Nov 18;116(20):4353-9.
129. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, Dale GL, Friese P, Esmon NL, et al. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*. 2011 Aug 18;118(7):1952-61.
130. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem*. 1989 Mar 25;264(9):4743-6.
131. Ammollo CT, Semeraro F, Xu J, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost*. 2011 Sep;9(9):1795-803.
132. Kambas K, Mitroulis I, Ritis K. The emerging role of neutrophils in thrombosis-the journey of TF through NETs. *Front Immunol*. 2012;3:385.
133. Holdenrieder S, Stieber P. Clinical use of circulating nucleosomes. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009;46(1):1-24.
134. Zeerleder S, Zwart B, Wuillemin WA, Aarden LA, Groeneveld AB, Caliezi C, et al. Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med*. 2003 Jul;31(7):1947-51.

135. Borissoff JI, Joosen IA, Versteyleen MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Aug;33(8):2032-40.
136. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 Aug 7;109(32):13076-81.
137. Caudrillier A, Looney MR. Platelet-neutrophil interactions as a target for prevention and treatment of transfusion-related acute lung injury. *Curr Pharm Des.* 2012;18(22):3260-6.
138. Stief TW, Kurz J, Doss MO, Fareed J. Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood. *Thromb Res.* 2000 Mar 15;97(6):473-80.
139. Gorlach A. Redox regulation of the coagulation cascade. *Antioxid Redox Signal.* 2005 Sep-Oct;7(9-10):1398-404.
140. Plow EF. The major fibrinolytic proteases of human leukocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1980 Jun 5;630(1):47-56.
141. Plow EF, Edgington TS. An alternative pathway for fibrinolysis. I. The cleavage of fibrinogen by leukocyte proteases at physiologic pH. *J Clin Invest.* 1975 Jul;56(1):30-8.
142. Oudijk EJ, Nieuwenhuis HK, Bos R, Fijnheer R. Elastase mediated fibrinolysis in acute promyelocytic leukemia. *Thromb Haemost.* 2000 Jun;83(6):906-8.
143. Kamikura Y, Wada H, Nobori T, Matsumoto T, Shiku H, Ishikura K, et al. Elevated plasma levels of fibrin degradation products by granulocyte-derived elastase in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res.* 2005;115(1-2):53-7.
144. Kluft C. The fibrinolytic system and thrombotic tendency. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2004 Dec;33(5-6):425-9.
145. Moir E, Robbie LA, Bennett B, Booth NA. Polymorphonuclear leucocytes have two opposing roles in fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 2002 Jun;87(6):1006-10.
146. Turkington PT, Blumsom NL, Elmore DT. The degradation of bovine and human prothrombin by human polymorphonuclear leukocyte cathepsin G. *Thromb Res.* 1986 Nov 1;44(3):339-45.
147. Brezniak DV, Brower MS, Witting JI, Walz DA, Fenton JW, 2nd. Human alpha- to zeta-thrombin cleavage occurs with neutrophil cathepsin G or chymotrypsin while fibrinogen clotting activity is retained. *Biochemistry.* 1990 Apr 10;29(14):3536-42.



148. Brower MS, Walz DA, Garry KE, Fenton JW, 2nd. Human neutrophil elastase alters human alpha-thrombin function: limited proteolysis near the gamma-cleavage site results in decreased fibrinogen clotting and platelet-stimulatory activity. *Blood*. 1987 Mar;69(3):813-9.
149. Nicolaisen EM, Petersen LC, Thim L, Jacobsen JK, Christensen M, Hedner U. Generation of Gla-domainless FVIIa by cathepsin G-mediated cleavage. *FEBS Lett*. 1992 Jul 20;306(2-3):157-60.
150. Turkington PT. Cathepsin G, a regulator of human vitamin K, dependent clotting factors and inhibitors. *Thromb Res*. 1992 Jul 15;67(2):147-55.
151. Turkington PT. Degradation of human factor X by human polymorphonuclear leucocyte cathepsin G and elastase. *Haemostasis*. 1991;21(2):111-6.
152. Gale AJ, Rozenshteyn D. Cathepsin G, a leukocyte protease, activates coagulation factor VIII. *Thromb Haemost*. 2008 Jan;99(1):44-51.
153. Samis JA, Kam E, Nesheim ME, Giles AR. Neutrophil elastase cleavage of human factor IX generates an activated factor IX-like product devoid of coagulant function. *Blood*. 1998 Aug 15;92(4):1287-96.
154. Takaki A, Enfield DL, Thompson AR. Cleavage and inactivation of Factor IX by granulocyte elastase. *J Clin Invest*. 1983 Nov;72(5):1706-15.
155. Steppich BA, Seitz I, Busch G, Stein A, Ott I. Modulation of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1 by neutrophil proteases. *Thromb Haemost*. 2008 Dec;100(6):1068-75.
156. Jochum M, Lander S, Heimbürger N, Fritz H. Effect of human granulocytic elastase on isolated human antithrombin III. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 1981 Feb;362(2):103-12.
157. Jordan RE, Kilpatrick J, Nelson RM. Heparin promotes the inactivation of antithrombin by neutrophil elastase. *Science*. 1987 Aug 14;237(4816):777-9.
158. Turkington PT. Cathepsin G can produce a gla-domainless protein C in vitro. *Thromb Res*. 1991 Aug 15;63(4):399-406.
159. Turkington PT. Cathepsin G activates human factor V in vitro. *Thromb Res*. 1993 Nov 15;72(4):333-7.
160. Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L. Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot. *Thromb Haemost*. 2007 Aug;98(2):359-67.
161. Henriksson P, Nilsson IM, Ohlsson K, Stenberg P. Granulocyte elastase activation and degradation of factor XIII. *Thromb Res*. 1980 May 1-15;18(3-4):343-51.
162. <http://www2.medicine.wisc.edu/home/hemonc/sheehanlab>.

163. Carson SD, Henry WM, Shows TB. Tissue factor gene localized to human chromosome 1 (1pter----1p21). *Science*. 1985 Sep 6;229(4717):991-3.
164. Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *Thromb Haemost*. 1997 Jul;78(1):747-54.
165. Cui MZ, Parry GC, Oeth P, Larson H, Smith M, Huang RP, et al. Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and EGR-1. *J Biol Chem*. 1996 Feb 2;271(5):2731-9.
166. Mackman N, Brand K, Edgington TS. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J Exp Med*. 1991 Dec 1;174(6):1517-26.
167. Oeth P, Parry GC, Mackman N. Regulation of the tissue factor gene in human monocytic cells. Role of AP-1, NF-kappa B/Rel, and Sp1 proteins in uninduced and lipopolysaccharide-induced expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Feb;17(2):365-74.
168. Eilertsen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004 Oct;15(7):521-38.
169. Morrissey JH, Fakhrai H, Edgington TS. Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell*. 1987 Jul 3;50(1):129-35.
170. Spicer EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, et al. Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Aug;84(15):5148-52.
171. Muller YA, Ultsch MH, de Vos AM. The crystal structure of the extracellular domain of human tissue factor refined to 1.7 A resolution. *J Mol Biol*. 1996 Feb 16;256(1):144-59.
172. Paborsky LR, Tate KM, Harris RJ, Yansura DG, Band L, McCray G, et al. Purification of recombinant human tissue factor. *Biochemistry*. 1989 Oct 3;28(20):8072-7.
173. Krudysz-Amblo J, Jennings ME, 2nd, Mann KG, Butenas S. Carbohydrates and activity of natural and recombinant tissue factor. *J Biol Chem*. 2009 Jan 29;285(5):3371-82.
174. Kothari H, Nayak RC, Rao LV, Pendurthi UR. Cystine 186-cystine 209 disulfide bond is not essential for the procoagulant activity of tissue factor or for its de-encryption. *Blood*. 2010 May 27;115(21):4273-83.
175. Rehemtulla A, Ruf W, Edgington TS. The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is required for binding of factor VII. *J Biol Chem*. 1991 Jun 5;266(16):10294-9.

176. Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, et al. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Sep 19;103(38):13932-7.
177. Krudysz-Amblo J, Jennings ME, 2nd, Matthews DE, Mann KG, Butenas S. Differences in the fractional abundances of carbohydrates of natural and recombinant human tissue factor. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Apr;1810(4):398-405.
178. Kelley RF, Costas KE, O'Connell MP, Lazarus RA. Analysis of the factor VIIa binding site on human tissue factor: effects of tissue factor mutations on the kinetics and thermodynamics of binding. *Biochemistry*. 1995 Aug 22;34(33):10383-92.
179. Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J*. 1994 Apr 1;8(6):385-90.
180. Kirchhofer D, Lipari MT, Moran P, Eigenbrot C, Kelley RF. The tissue factor region that interacts with substrates factor IX and Factor X. *Biochemistry*. 2000 Jun 27;39(25):7380-7.
181. Huang M, Syed R, Stura EA, Stone MJ, Stefanko RS, Ruf W, et al. The mechanism of an inhibitory antibody on TF-initiated blood coagulation revealed by the crystal structures of human tissue factor, Fab 5G9 and TF.G9 complex. *J Mol Biol*. 1998 Feb 6;275(5):873-94.
182. Morrissey JH, Neuenschwander PF, Huang Q, McCallum CD, Su B, Johnson AE. Factor VIIa-tissue factor: functional importance of protein-membrane interactions. *Thromb Haemost*. 1997 Jul;78(1):112-6.
183. Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey JH, Edgington TS. Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. *J Biol Chem*. 1991 Aug 25;266(24):16256.
184. Fiore MM, Neuenschwander PF, Morrissey JH. The biochemical basis for the apparent defect of soluble mutant tissue factor in enhancing the proteolytic activities of factor VIIa. *J Biol Chem*. 1994 Jan 7;269(1):143-9.
185. Sen M, Herzik M, Craft JW, Creath AL, Agrawal S, Ruf W, et al. Spectroscopic Characterization of Successive Phosphorylation of the Tissue Factor Cytoplasmic Region. *Open Spectrosc J*. 2009 Jan 1;3:58-64.
186. Bromberg ME, Konigsberg WH, Madison JF, Pawashe A, Garen A. Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 29;92(18):8205-9.
187. Martin DM, Boys CW, Ruf W. Tissue factor: molecular recognition and cofactor function. *FASEB J*. 1995 Jul;9(10):852-9.

188. Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, Edgington TS. Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J Cell Biol.* 1989 Jul;109(1):389-95.
189. Rivers RP, Hathaway WE, Weston WL. The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes. *Br J Haematol.* 1975 Jul;30(3):311-6.
190. Girard TJ, Nicholson NS. The role of tissue factor/factor VIIa in the pathophysiology of acute thrombotic formation. *Curr Opin Pharmacol.* 2001 Apr;1(2):159-63.
191. Hu Z, Garen A. Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Oct 9;98(21):12180-5.
192. Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Sato Y, Hara S, Kisanuki A, et al. The role of tissue factor in the pathogenesis of thrombosis and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 1998;4(3):135-9.
193. Osterud B. Tissue factor expression in blood cells. *Thromb Res.* 2010 Apr;125 Suppl 1:S31-4.
194. Osterud B, Breimo ES, Olsen JO. Blood borne tissue factor revisited. *Thromb Res.* 2008;122(3):432-4.
195. Camera M, Frigerio M, Toschi V, Brambilla M, Rossi F, Cottell DC, et al. Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Sep 1;23(9):1690-6.
196. Muller I, Klocke A, Alex M, Kotsch M, Luther T, Morgenstern E, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* 2003 Mar;17(3):476-8.
197. Zillmann A, Luther T, Muller I, Kotsch M, Spannagl M, Kauke T, et al. Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Feb 23;281(2):603-9.
198. Panes O, Matus V, Saez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5242-50.
199. Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med.* 2006 Oct 30;203(11):2433-40.
200. Bouchard BA, Krudysz-Amblo J, Butenas S. Platelet tissue factor is not expressed transiently after platelet activation. *Blood.* 2012 May 3;119(18):4338-9; author reply 9-41.

201. Bouchard BA, Mann KG, Butenas S. No evidence for tissue factor on platelets. *Blood*. 2010 Aug 5;116(5):854-5.
202. Osterud B, Olsen JO, Bjorklid E. What is blood borne tissue factor? *Thromb Res*. 2009 Nov;124(5):640-1.
203. Osterud B, Olsen JO. Human platelets do not express tissue factor. *Thromb Res*. 2013 Jul;132(1):112-5.
204. Khan AR, James MN. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci*. 1998 Apr;7(4):815-36.
205. Ruf W. The interaction of activated factor VII with tissue factor: insight into the mechanism of cofactor-mediated activation of activated factor VII. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998 Mar;9 Suppl 1:S73-8.
206. Olsen OH, Rand KD, Ostergaard H, Persson E. A combined structural dynamics approach identifies a putative switch in factor VIIa employed by tissue factor to initiate blood coagulation. *Protein Sci*. 2007 Apr;16(4):671-82.
207. Waters EK, Yegneswaran S, Morrissey JH. Raising the active site of factor VIIa above the membrane surface reduces its procoagulant activity but not factor VII autoactivation. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;281(36):26062-8.
208. Bom VJ, Reinalda-Poot JH, Cupers R, Bertina RM. Extrinsic activation of human blood coagulation factors IX and X. *Thromb Haemost*. 1990 Apr 12;63(2):224-30.
209. McCallum CD, Su B, Neuenschwander PF, Morrissey JH, Johnson AE. Tissue factor positions and maintains the factor VIIa active site far above the membrane surface even in the absence of the factor VIIa Gla domain. A fluorescence resonance energy transfer study. *J Biol Chem*. 1997 Nov 28;272(48):30160-6.
210. Bom VJ, Bertina RM. The contributions of Ca<sup>2+</sup>, phospholipids and tissue-factor apoprotein to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor VII. *Biochem J*. 1990 Jan 15;265(2):327-36.
211. Albrektsen T, Sorensen BB, Hjortoe GM, Fleckner J, Rao LV, Petersen LC. Transcriptional program induced by factor VIIa-tissue factor, PAR1 and PAR2 in MDA-MB-231 cells. *J Thromb Haemost*. 2007 Aug;5(8):1588-97.
212. Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK, et al. Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood*. 2004 Apr 15;103(8):3029-37.

213. Ahamed J, Ruf W. Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 2004 May 28;279(22):23038-44.
214. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med*. 2004 May;10(5):502-9.
215. Ryden L, Grabau D, Schaffner F, Jonsson PE, Ruf W, Belting M. Evidence for tissue factor phosphorylation and its correlation with protease-activated receptor expression and the prognosis of primary breast cancer. *Int J Cancer*. 2009 May 15;126(10):2330-40.
216. Ott I, Weigand B, Michl R, Seitz I, Sabbari-Erfani N, Neumann FJ, et al. Tissue factor cytoplasmic domain stimulates migration by activation of the GTPase Rac1 and the mitogen-activated protein kinase p38. *Circulation*. 2005 Jan 25;111(3):349-55.
217. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
218. Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Sumiyoshi A. Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells. *Thromb Haemost*. 1996 Mar;75(3):389-92.
219. Siegbahn A, Johnell M, Rorsman C, Ezban M, Heldin CH, Ronnstrand L. Binding of factor VIIa to tissue factor on human fibroblasts leads to activation of phospholipase C and enhanced PDGF-BB-stimulated chemotaxis. *Blood*. 2000 Nov 15;96(10):3452-8.
220. Koizume S, Jin MS, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Piao JH, et al. Activation of cancer cell migration and invasion by ectopic synthesis of coagulation factor VII. *Cancer Res*. 2006 Oct 1;66(19):9453-60.
221. Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmback K, Danton MJ, et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 25;93(13):6258-63.
222. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*. 1996 Sep 5;383(6595):73-5.
223. Zhang Y, Deng Y, Luther T, Muller M, Ziegler R, Waldherr R, et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):1320-7.
224. Parry GC, Erlich JH, Carmeliet P, Luther T, Mackman N. Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *J Clin Invest*. 1998 Feb 1;101(3):560-9.

225. Parry GC, Mackman N. Mouse embryogenesis requires the tissue factor extracellular domain but not the cytoplasmic domain. *J Clin Invest*. 2000 Jun;105(11):1547-54.
226. Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A, Vlasuk GP, Rote WE, Green SJ, et al. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res*. 2003 Jun 1;63(11):2997-3000.
227. Lucchi L, Ligabue G, Marietta M, Delnevo A, Malagoli M, Perrone S, et al. Activation of coagulation during hemodialysis: effect of blood lines alone and whole extracorporeal circuit. *Artif Organs*. 2006 Feb;30(2):106-10.
228. Desormeaux A, Moreau ME, Lepage Y, Chanard J, Adam A. The effect of electronegativity and angiotensin-converting enzyme inhibition on the kinin-forming capacity of polyacrylonitrile dialysis membranes. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(9):1139-46.
229. Frank RD, Weber J, Dresbach H, Thelen H, Weiss C, Floege J. Role of contact system activation in hemodialyzer-induced thrombogenicity. *Kidney Int*. 2001 Nov;60(5):1972-81.
230. Hong J, Nilsson Ekdahl K, Reynolds H, Larsson R, Nilsson B. A new in vitro model to study interaction between whole blood and biomaterials. Studies of platelet and coagulation activation and the effect of aspirin. *Biomaterials*. 1999 Apr;20(7):603-11.
231. van der Kamp KW, Hauch KD, Feijen J, Horbett TA. Contact activation during incubation of five different polyurethanes or glass in plasma. *J Biomed Mater Res*. 1995 Oct;29(10):1303-6.
232. Hong J, Larsson R, Ekdahl KN, Elgue G, Larsson R, Nilsson B. Contact between a polymer and whole blood: sequence of events leading to thrombin generation. *J Lab Clin Med*. 2001 Aug;138(2):139-45.
233. Davenport A. Review article: Low-molecular-weight heparin as an alternative anticoagulant to unfractionated heparin for routine outpatient haemodialysis treatments. *Nephrology (Carlton)*. 2009 Aug;14(5):455-61.
234. De Caterina R, Husted S, Wallentin L, Agnelli G, Bachmann F, Baigent C, et al. Anticoagulants in heart disease: current status and perspectives. *Eur Heart J*. 2007 Apr;28(7):880-913.
235. Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. Mechanism of action and pharmacology of unfractionated heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Jul;21(7):1094-6.
236. Ryckelynck JP, Chouraqui D, Lobbedez T. [Anticoagulation of the extracorporeal circuit in chronic hemodialysis]. *Nephrologie*. 1998;19(4):223-5.

237. Klejna K, Naumnik B, Koc-Zorawska E, Mysliwiec M. Effect of Unfractionated and Low-Molecular-Weight Heparin on OPG, sRANKL, and von Willebrand Factor Concentrations During Hemodialysis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012 Oct 26.
238. Donat F, Duret JP, Santoni A, Cariou R, Necciari J, Magnani H, et al. The pharmacokinetics of fondaparinux sodium in healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41 Suppl 2:1-9.
239. Hirsh J, Bauer KA, Donati MB, Gould M, Samama MM, Weitz JI. Parenteral anticoagulants: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008 Jun;133(6 Suppl):141S-59S.
240. Vidal. 2010 Issy-Les-Moulineaux.
241. Haase M, Bellomo R, Rocktaeschel J, Ziemer S, Kiesewetter H, Morgera S, et al. Use of fondaparinux (ARIXTRA) in a dialysis patient with symptomatic heparin-induced thrombocytopenia type II. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Feb;20(2):444-6.
242. Montagnac R, Brahimi S, Janian P, Melin JP, Bertocchio JP, Wynckel A. Use of fondaparinux during hemodialysis in heparin-induced thrombocytopenia. About a new observation. *Nephrol Ther*. 2010 Dec;6(7):581-4.
243. Kalicki RM, Aregger F, Alberio L, Lammle B, Frey FJ, Uehlinger DE. Use of the pentasaccharide fondaparinux as an anticoagulant during haemodialysis. *Thromb Haemost*. 2007 Dec;98(6):1200-7.
244. Sombolos KI, Fragia TK, Gionanlis LC, Veneti PE, Bamichas GI, Frigidis SK, et al. Use of fondaparinux as an anticoagulant during hemodialysis: a preliminary study. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2008 Apr;46(4):198-203.
245. Polkinghorne KR, McMahon LP, Becker GJ. Pharmacokinetic studies of dalteparin (Fragmin), enoxaparin (Clexane), and danaparoid sodium (Orgaran) in stable chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2002 Nov;40(5):990-5.
246. Twardowski ZJ. History of hemodialyzers' designs. *Hemodial Int*. 2008 Apr;12(2):173-210.
247. Benz K, Nauck MA, Bohler J, Fischer KG. Hemofiltration of recombinant hirudin by different hemodialyzer membranes: implications for clinical use. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007 May;2(3):470-6.
248. Davenport A. Heparin-induced thrombocytopenia during renal replacement therapy. *Hemodial Int*. 2004 Jul 1;8(3):295-303.



249. Flanigan MJ, Pillsbury L, Sadewasser G, Lim VS. Regional hemodialysis anticoagulation: hypertonic tri-sodium citrate or anticoagulant citrate dextrose-A. *Am J Kidney Dis.* 1996 Apr;27(4):519-24.
250. Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol.* 2007 Apr;28(4):184-92.
251. Itoh S, Takeshita K, Susuki C, Shige-Eda K, Tsuji T. Redistribution of P-selectin ligands on neutrophil cell membranes and the formation of platelet-neutrophil complex induced by hemodialysis membranes. *Biomaterials.* 2008 Jul;29(21):3084-90.
252. Peerschke EI, Ghebrehiwet B. Platelet receptors for the complement component C1q: implications for hemostasis and thrombosis. *Immunobiology.* 1998 Aug;199(2):239-49.
253. Erlenkotter A, Endres P, Nederlof B, Hornig C, Vienken J. Score model for the evaluation of dialysis membrane hemocompatibility. *Artif Organs.* 2008 Dec;32(12):962-9.
254. Thomas M, Valette P, Mausset AL, Dejardin P. High molecular weight kininogen adsorption on hemodialysis membranes: influence of pH and relationship with contact phase activation of blood plasma. influence of pre-treatment with poly(ethyleneimine). *Int J Artif Organs.* 2000 Jan;23(1):20-6.
255. Moachon N, Boullange C, Fraud S, Vial E, Thomas M, Quash G. Influence of the charge of low molecular weight proteins on their efficacy of filtration and/or adsorption on dialysis membranes with different intrinsic properties. *Biomaterials.* 2002 Feb;23(3):651-8.
256. Seyfert UT, Helmling E, Hauck W, Skroch D, Albert W. Comparison of blood biocompatibility during haemodialysis with cuprophane and polyacrylonitrile membranes. *Nephrol Dial Transplant.* 1991;6(6):428-34.
257. Chanard J, Lavaud S, Paris B, Toure F, Rieu P, Renaux JL, et al. Assessment of heparin binding to the AN69 ST hemodialysis membrane: I. Preclinical studies. *ASAIO J.* 2005 Jul-Aug;51(4):342-7.
258. Lavaud S, Canivet E, Wuillai A, Maheut H, Randoux C, Bonnet JM, et al. Optimal anticoagulation strategy in haemodialysis with heparin-coated polyacrylonitrile membrane. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Oct;18(10):2097-104.
259. Lavaud S, Paris B, Maheut H, Randoux C, Renaux JL, Rieu P, et al. Assessment of the heparin-binding AN69 ST hemodialysis membrane: II. Clinical studies without heparin administration. *ASAIO J.* 2005 Jul-Aug;51(4):348-51.
260. Chanard J, Lavaud S, Maheut H, Kazes I, Vitry F, Rieu P. The clinical evaluation of low-dose heparin in haemodialysis: a prospective study using the heparin-coated AN69 ST membrane. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Jun;23(6):2003-9.

261. Fischer M, Sperling C, Tengvall P, Werner C. The ability of surface characteristics of materials to trigger leukocyte tissue factor expression. *Biomaterials*. 2009 Mar;31(9):2498-507.
262. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 2000 Jan;12(1):1-13.
263. Grooteman MP, Bos JC, van Houte AJ, van Limbeek J, Schoorl M, Nube MJ. Mechanisms of intra-dialyser granulocyte activation: a sequential dialyser elution study. *Nephrol Dial Transplant*. 1997 Mar;12(3):492-9.
264. Grooteman MP, Nube MJ, van Houte AJ, Schoorl M, van Limbeek J. Granulocyte sequestration in dialysers: a comparative elution study of three different membranes. *Nephrol Dial Transplant*. 1995 Oct;10(10):1859-64.
265. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
266. Sioulis A, Malindretos P, Makedou A, Makris P, Grekas D. Coagulation factors as biological risk markers of endothelial dysfunction. Association with the thrombotic episodes of chronic hemodialysis patients. *Hippokratia*. 2009 Oct;13(4):237-41.
267. Stobe J, Siegemund A, Achenbach H, Preiss C, Preiss R. Evaluation of the pharmacokinetics of dalteparin in patients with renal insufficiency. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2006 Oct;44(10):455-65.
268. Naumnik B, Borawski J, Mysliwiec M. Different effects of enoxaparin and unfractionated heparin on extrinsic blood coagulation during haemodialysis: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Jul;18(7):1376-82.
269. Naumnik B, Rydzewska-Rosolowska A, Mysliwiec M. Different effects of enoxaparin, nadroparin, and dalteparin on plasma TFPI during hemodialysis: a prospective crossover randomized study. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2010 Oct;17(5):480-6.
270. Parratt R, Hunt BJ. Direct activation of factor X by monocytes occurs during cardiopulmonary bypass. *Br J Haematol*. 1998 Apr;101(1):40-6.
271. Plescia J, Altieri DC. Activation of Mac-1 (CD11b/CD18)-bound factor X by released cathepsin G defines an alternative pathway of leucocyte initiation of coagulation. *Biochem J*. 1996 Nov 1;319 ( Pt 3):873-9.
272. Friedrich B, Alexander D, Janessa A, Haring HU, Lang F, Risler T. Acute effects of hemodialysis on cytokine transcription profiles: evidence for C-reactive protein-dependency of mediator induction. *Kidney Int*. 2006 Dec;70(12):2124-30.

273. Ben-Hadj-Khalifa-Kechiche S, Hezard N, Poitevin S, Remy MG, Florent B, Mahjoub T, et al. Differential inhibitory effect of fondaparinux on the procoagulant potential of intact monocytes and monocyte-derived microparticles. *J Thromb Thrombolysis*. 2010 Nov;30(4):412-8.

**RESUME :** L'objectif de ce travail est d'évaluer le rôle du facteur tissulaire (FT) dans l'initiation de la coagulation d'un circuit d'hémodialyse. A partir de l'analyse des membranes d'hémodialyse, nous avons observé que les leucocytes et, majoritairement les polynucléaires neutrophiles (PNN) adhéraient aux membranes hémocompatibles (de type AN69ST). Ces cellules expriment un FT fonctionnel. Nous avons développé différents modèles d'étude de l'expression du FT par les PNN. A partir de PNN humains obtenus chez des sujets sains, nous montrons que les PNN expriment le FT après stimulation par le TNF. L'IL-8, chemokine chimioattractante des PNN augmentent, par un effet de priming, l'expression de FT en réponse au TNF. L'inhibition de l'adhésion par un anticorps dirigé contre les  $\beta$ 2-intégrines, induit une diminution de l'expression de FT en réponse au TNF. L'inhibition de la voie de signalisation MEK1/2, la p38 MAPK, et des radicaux libres oxygénés, inhibe également cette expression. A partir de PNN provenant de péritonites secondaires à une dialyse péritonéale, nous avons mis en évidence une forte expression de FT par ces PNN (ARNm et protéine). Le FT possède un fort potentiel pro-coagulant. Ce modèle physiopathologique est la conséquence d'une migration et d'une activation inflammatoire comparable au modèle que nous avons développé *in-vitro*. Dans l'objectif de faire la preuve de ce nouveau concept, nous avons évalué un facteur VII humain recombinant inactivé (FVIIai) dans un modèle d'hémodialyse chez le mouton. Nos résultats sont en faveur d'un effet anticoagulant du circuit d'hémodialyse, sans effet anticoagulant mesurable chez l'animal.

**Mots clés:** Hémodialyse, Facteur Tissulaire, Neutrophiles, Anticoagulation, Biocompatibilité.

**ABSTRACT:** The objective of this study is to analyse the role of Tissue Factor, the unique physiological trigger on thrombin generation. Analysing haemodialysis membranes, we found that leukocytes, mainly polymorphonuclear neutrophils (PMN) adhere to hemocompatible (AN69ST) membranes. These cells express a functional TF. We next showed that human PMN obtained from healthy subjects expressed TF in response to TNF. IL-8, a major chemokine involved in PMN chemoattraction primed TNF-induced TF by PMN. TF expression was down regulated when  $\beta$ 2 integrins were blocked by a potent antibody. The inhibition of MEK1/2, p38 MAPK and free radicals reduced TF expression. We observed, that PMN obtained from patients experiencing peritonitis, expressed high levels of TF (mRNA and protein). Functional assays measuring Xa generation and kinetics of thrombin generation (thrombinography) indicate the strong procoagulant potential of these cells. This physiopathological model is close to our *in vitro* model as it results from PMN migration and inflammatory activation. For proof of concept, we evaluated the effect of an inactivated human recombinant factor VIIa ( FVIIai) in a sheep model of hemodialysis. Our results show that FVIIai limits haemodialysis circuit coagulation without any measurable systemic anticoagulant effect.

**keywords:** Haemodialysis, Tissue Factor, Neutrophils, Anticoagulation, Biocompatibility.

**Discipline :** Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Hémostase et Remodelage Vasculaire Post-Ischémie (HERVI) Unité de recherche EA 3801** Dir. Pr. Philippe NGUYEN UFR Médecine URCA.

1 avenue du Maréchal Juin, 51095 Reims, Cedex, France.