NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
Le 17 janvier 2024 par

Raphaël CAUCHOIS

Exploration et modulation de l'activation endothéliale au cours du Purpura Thrombotique Thrombocytopénique

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Pathologies Vasculaire et Nutrition

École doctorale
ED 62 Science de la Vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
- INSERM, INRAE, C2VN
- Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, CHU Conception

Composition du jury

Paul COPPO *Sorbonne Université*	Rapporteur
Ygal BENHAMOU *Université de Rouen Normandie*	Rapporteur
Véronique FREMEAUX-BACCHI *INSERM (UMR) S1138*	Examinatrice
Françoise DIGNAT-GEORGE *Aix-Marseille Université*	Présidente du jury
Gilles KAPLANSKI *Aix-Marseille Université*	Directeur de thèse
Edwige TELLIER *Aix-Marseille Université*	Co-encadrante de thèse

Affidavit

Je soussigné, Raphaël CAUCHOIS par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique du Professeur Gilles KAPLANSKI et du Docteur Edwige TELLIER, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 7 novembre 2023



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications et/ou brevet réalisées dans le cadre du projet de thèse :

   1. **Cauchois R**, Muller R, Lagarde M, Dignat-George F, Tellier E, Kaplanski G, Is Endothelial Activation a Critical Event in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura? ***Journal of Clinical Medicine, 2022****, IF=4.96*

   2. **Cauchois R**, Lagarde M, Muller R, Faccini J, Leroyer A, Arnaud L, Poullin P, Dignat-George F, Kaplanski G and Tellier E, VE-Cadherin is involved in endothelial cell detachment during thrombotic thrombocytopenic purpura (**en révision dans *Journal of Thrombosis and Haemostasis***)

   3. Tellier E, Widemann A, **Cauchois R**, Faccini F, Lagarde M, Brun M, Robert P, Robert S, Bachelier R, Poullin P, Roose E, Vanhoorelbeke K, Coppo P, Dignat-George F, Kaplanski G, Immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura plasma induces calcium- and IgG-dependent endothelial activation: correlations with disease severity***, Haematologica, 2022*****,*** *IF = 11.05*

   4. **Cauchois R**, Koubi M, Delarbre D, Manet C, Carvelli J, Blasco V, Jean R, Fouche L, Bornet C, Pauly V, Mazodier K, Jarrot P-A, Dinarello CA, Kaplanski G, Early IL-1 receptor blockade in severe inflammatory respiratory failure complicating COVID-19, ***Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) 2020****, IF=12.78*

   5. **Cauchois R,** Pietri L, Dalmas JB, Koubi M, Capron T, Potere N, Polidoro, Jean R, Jarrot PA, André B, Veit V, Carvelli J, Pauly V, Chanez P, Papazian L, Kaplanski G, Eosinopenia as Predictor of Poor Outcome in Hospitalized COVID-19 Adult Patients from Waves 1 and 2 of 2020 Pandemic, ***Microorganisms****, 2022, IF=4.83*

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

   1. Communication orale : « L'endothélium au cours du PTT : faites entrer l'accusé », congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, (SFTS Marseille, 2021)
   2. Communication orale à la journée MAT du CRMR de Marseille : « Complément et PTT » (Marseille, 2021)
   3. Poster « Quelle gestion des antithrombotiques pour les embolies pulmonaires au cours des PTT auto-immuns traités par caplacizumab ? », au congrès de la société française d'hématologie (SFH, Paris, 2020)

Résumé

Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) est une microangiopathie thrombotique sévère liée à un déficit en ADAMTS13. Néanmoins, l'activation endothéliale joue également un rôle crucial. L'objectif de mon travail a été d'étudier les conséquences de l'activation endothéliale au cours du PTT sur la perméabilité vasculaire, et d'inhiber pharmacologiquement la dégranulation endothéliale *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin.

Nous avons montré que des plasmas de patients atteints de PTT (vs des plasmas de patients contrôles) induisent un décollement des cellules endothéliales HUVEC *in vitro*. Ces modifications jonctionnelles impliquent la phosphorylation Ca^{2+}-dépendante et l'internalisation de la VE-Cadhérine et cet effet est reproduit par la fraction IgG des patients. De plus, l'étude de la perméabilité vasculaire chez la souris a montré que les plasmas de patients PTT induisaient une majoration de la perméabilité qui pouvait être corrigée un inhibiteur du flux calcique intracellulaire, l'ITF1697.

Nous avons testé l'ITF1697 comme inhibiteur de la dégranulation sur un modèle murin de PTT qui consistait en l'injections de fortes doses d'IL-1β chez des souris KO ADAMTS13. Malgré un faible effet sur le flux calcique intracellulaire *in vitro*, l'ITF1697 n'a pas permis d'inhiber la dégranulation endothéliale et n'a pas montré d'effet protecteur sur les plaquettes dans ce modèle.

Au cours de ma thèse, j'ai également travaillé sur le COVID-19. Nous avons montré dans une série de 551 patients que l'éosinopénie profonde était un facteur prédictif des formes sévères de COVID-19. De plus, nous avons montré que l'utilisation d'IL-1Ra recombinant pouvait apporter un bénéfice chez les patients les plus sévères, témoignant de l'importance des IL-1 au cours des états hyperinflammatoires et de l'immunothrombose.

Mots clés : PTT, Endothélium, Perméabilité, IL-1, COVID-19

Abstract

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a severe thrombotic microangiopathy associated with ADAMTS13 deficiency. However, endothelial activation also seems to play a crucial role. The aim of my work is to investigate the consequences of endothelial activation during TTP on endothelial junctions and cell detachment, and to pharmacologically inhibit endothelial degranulation in vitro and in vivo in a mouse model.

We showed that plasmas from TTP patients (compared with plasmas from control patients) induce endothelial cell detachment in vitro, involving Ca2+-dependent phosphorylation and internalization of VE-cadherin, and that this effect was reproduced by the patient IgG fraction. In addition, examination of vascular permeability in mice showed that plasmas from TTP patients induced an increase in permeability that could be normalized by an inhibitor of intracellular calcium flux, ITF1697.

We tested ITF1697 as a degranulation inhibitor in a mouse model of TTP in which ADAMTS13 KO mice were administered high doses of IL-1β. Despite a discrete in vitro effect on intracellular calcium flux, ITF1697 failed to inhibit endothelial degranulation and showed no protective effect on platelets in this model.

During my PhD research, we also looked at COVID-19. In a series of 551 patients, we showed that marked eosinopenia is a predictive factor for severe forms of COVID-19. In addition, we have shown that the use of recombinant IL-1Ra may be beneficial in the most severe patients, highlighting the importance of IL-1 in hyperinflammatory states and immunothrombosis.

Keywords: TTP, Endothelium, Permeability, IL-1, COVID-19

Remerciements

Je remercie sincèrement le Pr Paul Coppo et le Pr Ygal Benhamou, éminents spécialistes du PTT, qui me font l'honneur de critiquer ce travail. Je remercie également chaleureusement le Pr Françoise Dignat-George qui a accepté de présider ce jury, et le Dr Véronique Frémeaux-Bacchi qui a accepté d'examiner ce travail.

J'exprime toute ma gratitude au Pr Gilles Kaplanski, qui m'a accompagné depuis le début de mon internat, m'a formé, m'a accordé sa confiance, et m'a toujours soutenu. Votre passion pour la médecine translationnelle, ce regard qui explore le vivant de la molécule à la pathologie, ce geste qui tisse les liens et dévoile les solutions, je crois que vous le transmettez chaque jour à vos élèves, dont j'ai la grande chance de faire partie. Un de vos enseignements qui m'accompagnera est la conviction que la recherche fondamentale est – malgré de nécessaires contraintes – un espace de *liberté intellectuelle*.

Je remercie très chaleureusement le Dr Edwige Tellier, qui m'a fait découvrir le monde du laboratoire depuis 2017 et sans qui, je crois, rien n'eût été possible. Tes qualités scientifiques, techniques et humaines m'ont beaucoup apporté. Bien sûr je remercie également Marie Lagarde et mes co-doctorants Romain et Yeter, et plus généralement les équipes du C2VN, qui m'ont si bien accueilli.

J'ai une pensée aimante pour ma famille, qui m'a toujours soutenu dans mes choix.

Je remercie mes amis, qui font que ma vie est douce.

Je remercie Mélanie, qui fait que ma vie est belle.

Table des matières

Liste de publications et participation aux conférences *3*

Résumé *4*

Abstract *5*

Remerciements *6*

Table des matières *7*

Avant-propos *11*

Éléments bibliographiques *12*

1. Le purpura thrombotique thrombocytopénique 13

1.1 Introduction 13
1.2 Historique 14
1.3 Epidémiologie 16
1.3.1 Le PTT auto-immun 16
1.3.2 Le PTT congénital 17
1.4 Physiopathologie 18
1.4.1 Présentation des différents acteurs 18
1.4.1.1 Le facteur von Willebrand 18
1.4.1.2 ADAMTS13 18
1.4.1.3 Les Ac anti-ADAMTS13 19
1.4.2 Du déficit en ADAMTS13 à la triade des MAT 21
1.5 Diagnostic du PTT 22
1.5.1 Présentation clinique et biologique du PTTi 22
1.5.2 Diagnostics différentiels 24
1.5.2.1 Les diagnostics différentiels qui ne sont pas des MAT 24
1.5.2.2 Les MAT qui ne sont pas des PTT 25
1.5.3 L'importance d'un score prédictif 29
1.5.4 La confirmation du diagnostic 30
1.6 Marqueurs pronostiques et facteurs de gravité 31
1.7 Prise en charge du PTT auto-immun 33
1.7.1 Prise en charge initiale 33
1.7.1.1 Considérations générales et terminologie 33
1.7.1.2 Plasmathérapie 34
1.7.1.3 Rituximab 34
1.7.1.4 Caplacizumab 35
1.7.1.5 Mesures adjuvantes 36
1.7.1.6 Une ADAMTS13 recombinante pour l'avenir ? 36
1.7.2 Quelle gestion de la persistance du déficit en ADAMTS13 ? 37
1.8 Evolution à long terme 38
1.8.1 Les rechutes 38
1.8.2 Complications du traitement immunosuppresseur 38
1.8.3 L'auto-immunité associée 38
1.8.4 Les séquelles du PTT 39

2. L'endothélium 41

2.1 Présentation générale 41
2.2 Le concept de l'activation endothéliale 43
2.2.1 Considérations générales 43
2.2.1.1 Modifications phénotypiques 43
2.2.1.2 Vésiculation 43
2.2.1.3 Deux types d'activation endothéliale 44
2.2.2 Les Corps de Weibel-Palade 45
2.2.3 De l'activation endothéliale à la dysfonction endothéliale 47
2.2.4 Comment explorer l'endothélium en pratique clinique ? 48
2.3 La perméabilité endothéliale 50
2.3.1 Quels sont éléments à l'origine de la fonction de perméabilité ? 51
2.3.1.1 Le glycocalyx 51
2.3.1.2 Les jonctions inter-endothéliales 51
2.3.2 Détail de la VE-Cadhérine 52
2.3.3 L'axe angiopoïétine-Tie 2 54

3. L'activation endothéliale au cours du PTT 55
3.1 Quels éléments témoignent de l'activation endothéliale au cours du PTT 55
3.1.1 Arguments cliniques 55
3.1.2 Exploration de l'endothélium au cours du PTT chez l'humain 55
3.1.2.1 Dosage des biomarqueurs solubles 55
3.1.2.2 Dosage du compartiment endothélial circulant 56
3.1.2.3 Données histologiques chez l'humain 57
3.1.3 Données issues de l'expérimentation *in vitro* 58
3.1.4 Données issues de l'expérimentation animale 59
3.1.4.1 Modèles murins 59
3.1.4.2 Modèle du babouin 61
3.1.4.3 Modèle du zebrafish 61
3.2 Quels facteurs déclenchants dans le modèle à « deux coups » ? 63
3.2.1 La grossesse 63
3.2.2 Les infections 63
3.2.2.1 Mécanismes supposés 63
3.2.2.2 Cas particulier du SARS-CoV-2 64
3.2.3 Les médicaments 65
3.2.4 Les anticorps 65
3.2.5 Autres 66
3.3 Les boucles d'amplification de l'agression endothéliale 67
3.3.1 Le système du complément 67
3.3.1.1 Présentation succincte du système du complément 67
3.3.1.2 Implication du complément dans d'autres MAT 69
3.3.1.3 Signes indirects de l'implication du complément au cours du PTT 71
3.3.1.4 les UL-vWF sont une plateforme d'activation de la voie alterne du complément 72
3.3.1.5 La P-sélectine endothéliale 74
3.3.1.6 Cibler le complément au cours du PTT 75
3.3.2 L'hémolyse 75
3.3.3 Les nucléosomes 76
3.4 Un modèle d'étude de l'agression endothéliale : les MAT satellites d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques 78
3.5 Le phénotype endothélial comme déterminant de la sélectivité des atteintes d'organes 80
3.6 Conclusion 81

4. Revue publiée 82

Résultats expérimentaux 101

1. Hypothèse et objectifs du travail 103

2. Exploration du décollement endothélial au cours du PTT 105
2.1 Contexte 105
2.2 Article en révision (JTH, 2023) 107
2.3 Reviewing de l'article et complément de discussion 126

3. Inhibition de la dégranulation endothéliale au cours du PTT 129
3.1 Introduction 129
3.2 Matériels et méthodes 130
3.3 Résultats 133
3.3.1 Résultats *in vitro* 133
3.3.2 Résultats *in vivo* 135
3.1.2.1. Echecs du modèle « Shigatoxine » pour induire un PTT chez les souris 135
3.1.2.2. Echecs de l'utilisation d'autres activateurs endothéliaux classiques 136
2.1.2.2 Utilisation de l'IL-1 pour déclencher le PTT 138
3.4 Discussion des résultats 141

4. Travail réalisé au cours de la pandémie COVID-19 143
4.1 Contexte personnel 143
4.2 Contexte scientifique 144
4.2.1 Introduction concernant le COVID-19 144
4.2.2 L'endothélium au cours du COVID-19 144
4.2.2.1 Quels marqueurs d'agression endothéliale au cours du COVID-19 ? 145
4.2.2.2 Mécanismes à l'origine de l'hyperperméabilité vasculaire au cours du COVID-19 146
4.2.2.3 Mécanismes à l'origine de l'état procoagulant 147
4.2.2.4 Participation de l'endothélium au phénotype inflammatoire 148
4.2.3 Le COVID-19, un modèle d'immunothrombose 149
4.2.3.1 Qu'est-ce que l'immunothrombose ? 149
4.2.3.2 Implication des Interleukine-1 au cours de l'immunothrombose 150
4.2.3.3 Implication de l'axe inflammasome-IL-1β au cours du COVID-19 154
4.2.4 La nécessité de traitements et de biomarqueurs prédictifs des formes sévères 156
4.2.4.1 Quels traitements pour le COVID-19 en mars 2020 ? 156
4.2.4.2 Comment identifier les patients à risque ? 157
4.3 Article original (PNAS, 2020) 158
4.2.1 Introduction 158
4.3.2 L'article original 159
4.3.3 Eléments de discussion 163
4.4 Article original (Microorganisms, 2022) 164
4.4.1 Introduction 164
4.4.2 L'article original 165

Conclusion et perspectives 177

Annexes 179
Annexe 1 : Poster présenté à la SFH en 2020 181
Annexe 2 : Tellier *et al*, Haematologica 2022 182
Annexe 3 : El Sissy *et al*, Blood 2021 197
Annexe 4 : score de sévérité histologique 204
Annexe 5 : Activation endothéliale en conditions de culture dynamique 205
Annexe 6 : Echecs d'induction du PTT par différents activateurs 207
Annexe 7 : génotypage des souris 211
Annexe 8 : Guervilly *et al*, JID 2020 212
Annexe 9 : Guervilly *et al*, Blood Advance 2020 218
Annexe 10 : Kyriazopoulou *et al*, Lancet Rheumatol, 2021 226

Table des figures 235

Références bibliographiques.....239

Avant-propos

Au début de mes études de médecine, j'ai comme beaucoup d'étudiants découvert le terme de microangiopathies thrombotiques (MAT) dans les ouvrages d'hématologie et de néphrologie, avec une dichotomie très nette : il existait le PTT (purpura thrombotique thrombocytopénique) et le SHU (Syndrome Hémolytique et Urémique). Néanmoins, j'ai rapidement découvert que des situations très différentes (telles que la grossesse, l'hypertension sévère, des maladies auto-immunes…) pouvaient également se compliquer de « MAT ». Quel était donc le point commun, la *convergence mécanistique*, qui conduisait ces diverses situations à se compliquer de microthrombi diffus, avec la triade qui associe une ischémie des organes atteints, une thrombopénie de consommation et une hémolyse mécanique ?

La question est restée plusieurs années en suspens, avant que je participe, en tant qu'interne, à la prise en charge des malades atteints de PTT dans le service de Médecine Interne et Immunologie Clinique du Pr Kaplanski, dont c'était déjà depuis longtemps l'une des thématiques de recherche. C'est à cette occasion que j'ai commencé à entrevoir la place centrale qu'occupait l'endothélium dans la physiopathologie des MAT. J'ai continué à découvrir ce groupe de pathologies par le prisme d'autres spécialités au cours de mon internat (néphrologie, unité d'allogreffe de moelle osseuse, réanimation médicale, hémaphérèse), et la transversalité de ces « syndromes de MAT » a achevé de me convaincre que je souhaitais me plonger plus avant dans la compréhension de leurs physiopathologies.

J'ai ainsi eu la chance de réaliser un Master 2 en 2018 au C2VN (*Cardiovascular and Nutrition Research Center*), encadré par le Pr Kaplanski et le Dr Edwige Tellier, sur la thématique de l'endothélium au cours du PTT. Les premiers résultats obtenus m'ont permis d'envisager la poursuite en thèse de science à partir de novembre 2019. Deux années ont été réalisées à temps plein au laboratoire, financées par un Poste d'Accueil INSERM. Le projet initial portait essentiellement sur l'inhibition de la dégranulation endothéliale dans un modèle murin de PTT, et l'exploration des mécanismes à l'origine du décollement des cellules endothéliales.

Mes deux premières années de thèse se sont déroulées durant la période inédite des différentes vagues épidémiques à SARS-CoV-2, durant lesquelles j'ai quitté le laboratoire pour participer à la prise en charge des patients en unité COVID-19. J'ai intégré nos travaux sur le COVID-19 à ce manuscrit en essayant, autant que possible, de présenter aux lecteurs un travail cohérent.

ÉLEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Le purpura thrombotique thrombocytopénique

1.1 Introduction

Les microangiopathies thrombotiques (MAT) sont un groupe de maladies caractérisées par la formation de thrombi dans la microcirculation, et qui sont à l'origine d'une triade caractéristique : thrombopénie de consommation, anémie hémolytique mécanique et souffrance d'organe de sévérité variable. Il existe plusieurs manières de classer les MAT, mais on distingue habituellement les entités suivantes (Figure 1) :

- Le Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT), qui est une MAT liée à un déficit sévère d'activité de l'enzyme ADAMTS13 (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13)
- Les Syndromes Hémolytiques et Urémiques (SHU)
- Les MAT associées à des situations spécifiques (grossesse, cancers, traitements, maladies auto-immunes systémiques, crise hypertensive, allogreffe de cellules souches, infections).

Sans prise en charge adaptée, le PTT est quasi-systématiquement mortel dans les semaines qui suivent le diagnostic.[1] Il s'agit donc d'une pathologie dont le diagnostic doit être fait le plus vite possible afin d'initier la prise en charge spécifique en urgence. Le PTT est une pathologie souvent récidivante, et chaque poussée de la maladie expose le patient à un risque de décès.

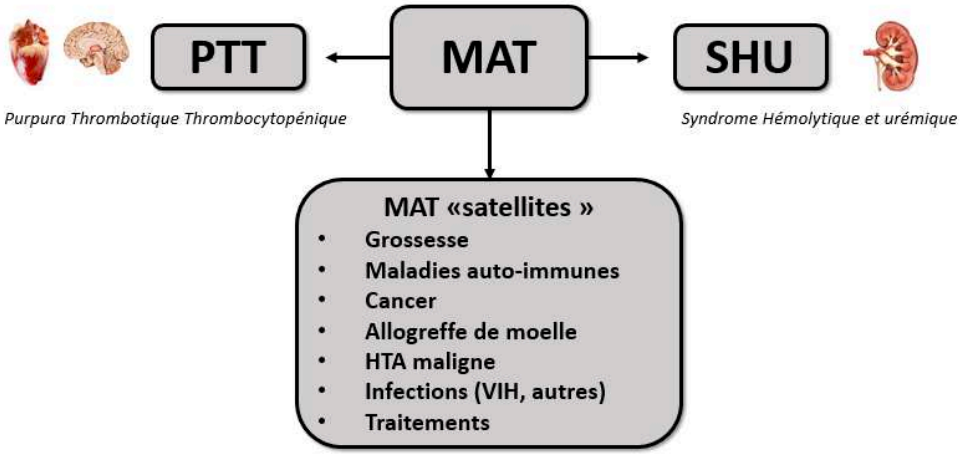


Figure 1: Classification usuelle des microangiopathies thrombotiques

1.2 Historique

Un cas correspondant très vraisemblablement à un PTT a été décrit pour la première fois en 1924 par Eli Moschcowitz dans le cas clinique suivant : « *An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries* ». Ce médecin américain rapporte en effet chez une patiente de 16 ans un tableau d'anémie, un syndrome hémorragique, des signes neurologiques, cardiaques et une insuffisance rénale ayant finalement conduit au décès de la jeune patiente. L'analyse autopsique révélait alors des microthrombi diffus artériolaires. Une série de 16 cas similaires a été publiée en 1966.[2] Des exemples de thrombi sont montrés sur la Figure 2.

Les connaissances sur la physiopathologie du PTT ont considérablement évolué depuis 40 ans. En 1982, Joel L. Moake a identifié l'incapacité de 4 patients atteints de PTT chronique à cliver les multimères ultralarges de facteur von Willebrand (UL-vWF).[3] En 2001, cette incapacité a été démontrée comme étant la conséquence d'un déficit en une métalloprotéinase nommée ADAMTS13[4,5]. Le déficit en ADAMTS13 peut être d'origine génétique, constituant alors le syndrome d'Upshaw-Schulman (<5% des cas),[6] ou d'origine auto-immune (>95% des cas), avec présence d'auto-anticorps anti-ADAMTS13.[7,8]

Le traitement du PTT a beaucoup évolué ces 50 dernières années (Figure 3), et les modalités de prise en charge sont détaillées plus loin dans ce document. Les échanges plasmatiques quotidiens, utilisés depuis les années 1970 (la première utilisation pour cette indication semble dater de 1959[9]), sont la pierre angulaire du traitement en phase aiguë et ont drastiquement amélioré le pronostic, diminuant la mortalité des deux premières semaines de 90% à moins de 20%.[10] Une corticothérapie y est très souvent associée, compte tenu du mécanisme auto-immun de la pathologie. Le Rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20) était initialement prescrit pour les patients en réponse suboptimale aux échanges plasmatiques, mais son utilisation est aujourd'hui systématique en 1ère intention, notamment pour diminuer la fréquence des rechutes.[11] En août 2018, le Caplacizumab, un nano-anticorps inhibant de manière compétitive la fixation des plaquettes au domaine A1 du vWF, a obtenu l'AMM dans le PTT autoimmun.[12–14]

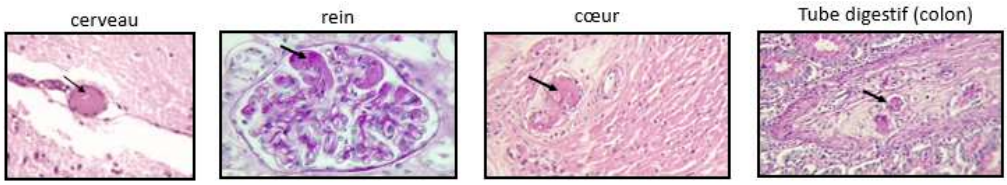


Figure 2: Thrombi diffus dans la microcirculation

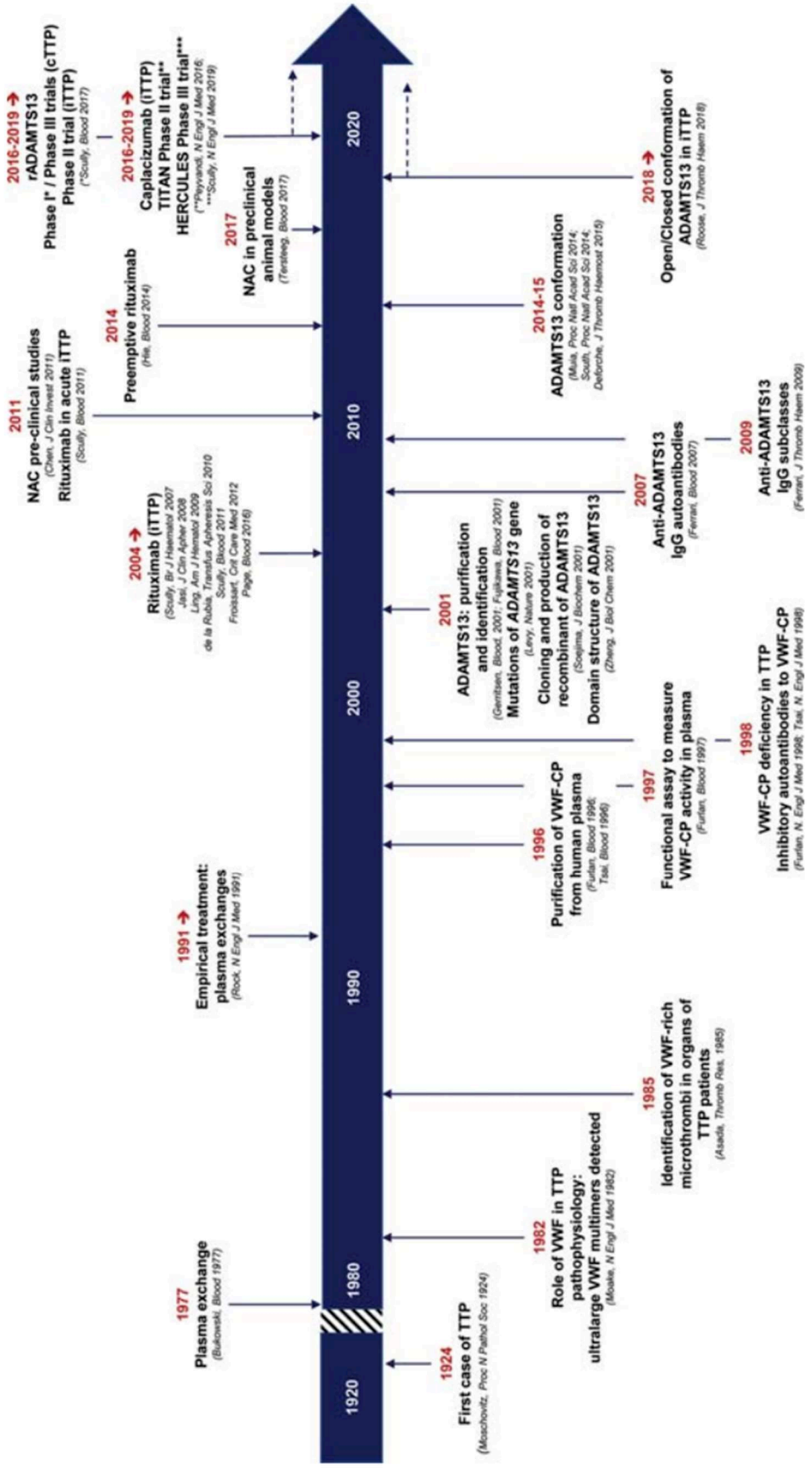


Figure 3: Dates clés dans la compréhension de la physiopathologie du PTT (adapté de Roose *et al*, 2020[15])

1.3 Epidémiologie

L'incidence annuelle est estimée à 2 à 3 cas par million d'habitants dans le monde,[16] avec une prévalence en France de 13 cas par million d'habitants, ce qui représente 24% des microangiopathies thrombotiques.[17] Néanmoins un travail récent d'analyse rétrospective de toutes les MAT survenues entre 2009 et 2016 dans 4 hôpitaux français montre que l'incidence du PTT est assez faible parmi les MAT.[18] En effet sur les 564 dossiers analysés, 3% correspondaient à un PTT, 3% à un SHU atypique et 94% étaient des MAT secondaires à une grossesse, une infection (dont Shigatoxine), des médicaments et des cancers. Des causes intriquées étaient souvent (57%) en cause dans les MAT secondaires.

1.3.1 Le PTT auto-immun

Le PTT auto-immun (PTTi*) affecte **principalement les adultes** : le pic d'incidence se situe entre 30 et 60 ans en Europe et aux Etats-Unis,[7,19] avec un âge médian au diagnostic de 41 ans (d'après le Oklahoma TTP-HUS Registry[16]), l'âge moyen semblant plus élevé chez les Japonais.[20] Comme dans d'autres pathologies auto-immunes, les femmes sont préférentiellement atteintes avec un **sexe ratio d'environ 3:1**.[7] Le PTTi est très rare chez les patients de moins de 18 ans. Les sujets à la peau noire et originaires d'Afrique du Nord semblent plus exposés.

Au-delà du caractère ethnique prédisposant, il existe probablement d'autres facteurs génétiques exposant à un surrisque de développer des anticorps (Ac) anti-ADAMTS13. On peut notamment citer une surreprésentation du **HLA-DRB1*11** et DQB1*03 chez les patients avec un PTTi, et une surreprésentation du HLA-DRB1*04 chez les sujets sains (allèle plus rare chez les populations noires, ce qui explique possiblement la plus grande fréquence du PTTi dans cette population).[21] Certains ont suggéré que le variant R1060W d'ADAMTS13 pourrait participer à la genèse des auto-anticorps anti-ADAMTS13[22], mais cela n'a jamais été démontré, et la fréquence de ce variant ne semble pas augmentée dans la population des PTTi.

Des **conditions prédisposantes sont identifiées dans un cas sur deux** : grossesse, maladie auto-immune, infection (notamment le VIH), cancer, traitements (antiagrégants plaquettaires, lenalidomide et check-point inhibiteurs).[17] Des manifestations auto-immunes sont fréquemment associées au PTTi, notamment des connectivites dont le Lupus érythémateux systémique.[23,24]

* Nous avons choisi l'acronyme PTTi pour rester proche de la traduction anglo-saxonne d'usage pour le PTT autoimmun (iTTP pour « immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura ») et pour coller au PNDS 2023, qui utilise cet acronyme.

1.3.2 Le PTT congénital

Dans le PTT congénital (PTTc) ou héréditaire, le déficit en ADAMTS13 est lié à des **mutations bi-alléliques** du gène *adamts13* (homozygote ou hétérozygote composite). Environ **200 mutations**[*] ont été identifiées et 2/3 d'entre elles sont des mutations faux-sens, le plus fréquent étant un variant faux-sens dans l'exon 24 R1060W (rs142572218), associé à l'apparition de la maladie à un âge plus avancé.[22,25,26] Comme souvent dans les maladies à transmission autosomique récessive, on retrouve régulièrement des antécédents de consanguinité. Le prévalence exacte du PTTc n'est pas connue, mais représente probablement **moins de 5% des cas de PTT**.[17,27] Il ne semble pas exister de sexe ratio. A taux résiduel égal de l'activité ADAMTS13, la pénétrance de la maladie est variable.

L'âge de diagnostic du PTTc a une distribution bimodale : la moitié des patients présente un premier épisode de PTT aigu entre 2 et 5 ans, et le second pic d'incidence a lieu chez les jeunes adultes, particulièrement pendant la grossesse[†] (au 3ème trimestre dans 75% des cas).[28] Lorsqu'une première poussée a lieu pendant la grossesse, la fréquence de la forme congénitale varie entre 25 et 66%, avec une prévalence élevée de la mutation p.R1060W dans les cohortes françaises et britanniques, mutation qui conduit à un déficit enzymatique moins sévère que les autres mutations.[29,30] Le PTT congénital doit être évoqué systématiquement devant une thrombopénie inexpliquée à la naissance, d'autant plus si elle s'associe à un ictère.

Notons que les individus portant des mutations du gène codant pour ADAMTS13 à l'état hétérozygote ne sont globalement pas malades : ils ont une activité ADAMTS13 autour de 50% (entre 30 et 100%[‡]), et peuvent présenter une discrète thrombopénie durant la grossesse ou au cours d'un épisode infectieux. Néanmoins le dépistage des apparentés est recommandé en cas de diagnostic de PTTc.

Devant une MAT avec une activité ADAMTS13 effondrée et sans auto-anticorps, la probabilité d'un déficit bi-allélique tient compte : i) de l'âge (si le tableau survient avant 5 ans il s'agit très vraisemblablement d'un PTT congénital), ii) de l'existence de comorbidités (sepsis, réanimation…) et iii) de la survenue au cours d'une première grossesse.

[*] Les mutations retrouvées chez l'enfant sont distribuées sur tout le gène, alors qu'il semble exister quelques « hotspot » mutationnels lorsque le diagnostic est fait à l'âge adulte.

[†] Dans le PTTc chez la femme, la 1ère grossesse déclenche presque toujours un épisode de PTT. On peut en conclure qu'un premier épisode de PTT sera quasiment toujours auto-immun s'il survient chez une patiente ayant mené auparavant une première grossesse non compliquée de MAT.

[‡] Les *outcomes* à long terme peuvent être différents en fonction de l'activité ADAMTS13 basale.

1.4 Physiopathologie

1.4.1 Présentation des différents acteurs

1.4.1.1 Le facteur von Willebrand

Le vWF est une protéine indispensable à l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium et à l'agrégation plaquettaire en cas de brèche vasculaire. Le gène *vwf* contient 52 exons et couvre 178 kb sur le chromosome 12p13.3. Dans le plasma, la concentration du vWF est d'environ 10 µg/mL et sa demi-vie est d'environ 12 heures. C'est une **glycoprotéine multimérique** qui est exclusivement synthétisée par les **cellules endothéliales** et par les **mégacaryocytes**.[31] La biosynthèse du vWF est complexe et implique un clivage d'un propeptide puis différents processus biochimiques (glycosylation, dimérisation, multimérisation).[32] Le pré-pro-vWF contient un peptide signal de 22 acides aminés, un propeptide de 741 acides aminés (D1-D2) et une sous-unité mature de 2050 acides aminés. La structure multimérique du vWF est définie par la présence de sous-unités matures liées de manière covalente, allant des dimères aux multimères de haut poids moléculaire. Les multimères de vWF sont sécrétés de 2 manières[31] :

- Une petite partie est sécrétée de manière continue.
- La majeure partie des multimères de vWF est accumulée sous forme de multimères de très haut poids moléculaire (UL-vWF, de poids moléculaire allant de 500 à 10000 kDa) dans des organelles de stockage au sein des cellules endothéliales, les Corps de Weibel-Palade (CWP), et dans une moindre mesure dans les granules alpha des plaquettes et des mégacaryocytes.

Le vWF a pour principal rôle d'assurer un lien adhésif initial entre les plaquettes (Gp1b plaquettaire) et le site de blessure endothéliale (sous endothélium ou endothélium inflammatoire)[*]. Il permet également le transport du facteur VIII et un rôle est évoqué dans le recrutement leucocytaire au cours de l'inflammation mais moins démontré.[33]

1.4.1.2 ADAMTS13

ADAMTS13 est la métalloprotéinase physiologiquement responsable du clivage des multimères de haut poids moléculaire de von-Willebrand en multimères de plus petite taille, moins pro-agrégants. Le gène *adamts13* est situé sur le chromosome 9. ADAMTS13 est principalement synthétisée par les cellules stellaires **hépatiques** (dites cellules de Ito),[34] et dans une moindre mesure par les cellules endothéliales,[35] les plaquettes,[36] les cellules épithéliales tubulaires rénales et les podocytes glomérulaires.[37] La concentration d'ADAMTS13 dans le sang est d'environ 1µg/mL, et sa demi-vie d'environ 2-3 jours.[38] Il n'existe pas d'inhibiteur physiologique connu d'ADAMTS13.

[*] Les forces de cisaillement à l'œuvre au sein de la microcirculation rendent le vWF plus affin pour les plaquettes, ce qui permet d'expliquer le tropisme microcirculatoire des thrombi au cours du PTT

ADAMTS13 se compose de plusieurs domaines (Figure 4) : un peptide signal (SP), un propeptide (PP), un domaine métalloprotéase (M), un domaine désintégrine (D), un premier motif thrombospondine de type 1 (T1), un domaine riche en cystéine (C), un domaine spacer (S), sept motifs thrombospondine de type 1 supplémentaires (T2-T8) et 2 domaines CUB. La protéine ADAMTS13 peut circuler dans une **forme active (ouverte) ou inactive** (fermée, dans laquelle il y a une interaction spacer-T8-CUB2).[39] Une première interaction entre le vWF et les domaines T5-CUB2 active de manière allostérique ADAMTS13, induisant une conformation ouverte d'ADAMTS13 dans laquelle il n'y a plus l'interaction entre le domaine spacer et le domaine CUB. Des études récentes montrent que dans la grande majorité des cas de PTTi, ADAMTS13 est ouverte en phase aiguë,[40] fermée en rémission et que si elle est ouverte en phase de rémission, un traitement préemptif par Rituximab permet de « refermer » la protéine.[41] Il est à noter que les Ac anti-ADAMTS13 purifiés peuvent induire l'ouverture de la protéase *in vitro*.[42]

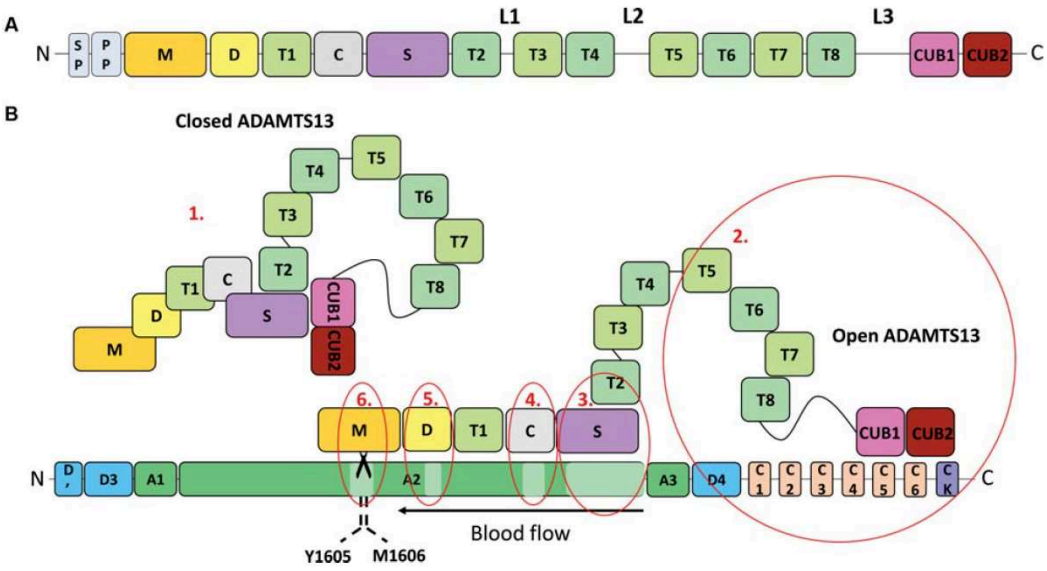


Figure 4: Structure d'ADAMTS13, avec les conformations ouvertes et fermées et interaction avec le vWF (adapté de Roose et Joly[15])

1.4.1.3 Les Ac anti-ADAMTS13

Dans le PTTi le déficit en ADAMTS13 est lié à la présence d'auto-anticorps anti-ADAMTS13. Chez la plupart des patients, ces anticorps ont une action **neutralisante**; mais chez 10 à 25% des patients, l'anticorps n'a pas d'effet inhibiteur direct et l'hypothèse a été émise que cet anticorps accélérait la **clairance** de l'enzyme.[43] Cet effet majorant la clairance de l'anticorps existe probablement quel que soit le pouvoir inhibiteur de l'anticorps, car dans la grande majorité des cas, le dosage de l'antigène ADAMTS13 est diminué dans les cas de PTT autoimmun.[44]

Les **Ac anti-ADAMTS13 ciblent le domaine spacer d'ADAMTS13** dans quasiment tous les cas (97-100%),[45] et la recherche en routine d'Ac anti-ADAMTS13 se fait par recherche de « l'anti-spacer domain », c'est-à-dire des 5 acides aminés principaux qui constituent la cible des Ac anti-ADAMTS13 (Arg 568, Phe 592, Arg 660, Tyr 661 et Tyr 665).[46] Notons néanmoins que si la quasi-totalité des patients atteints de PTTi ont un Ac anti-spacer, chez 2/3 des patients la **réaction immunitaire est polyclonale**, avec présence d'anticorps dirigés contre d'autres domaines.[47] Enfin il faut noter que des Ac anti-ADAMTS13 non inhibiteurs existent chez 4 à 15% des individus sains, souvent à un titre fluctuant et peu élevé.

La majorité des Ac anti-ADAMTS13 sont des **IgG** (présence également possible d'IgM et d'IgA),[48] particulièrement des IgG4 (suivi par les IgG1, IgG2 et IgG3). Les IgG4 sont associées à un risque de rechute plus élevé.[49] Chez certains patients atteints de PTTi, on peut doser des complexes immuns circulant [ADAMTS13-Ac anti ADAMTS13], qui peuvent perdurer à distance de l'épisode aigu, et qui seraient un facteur prédictif de rechute dans les 2 ans.[50] Comme décrit précédemment, certains anticorps favorisent une conformation « ouverte » d'ADAMTS13, démasquant ainsi des épitopes cryptiques.[40,51] L'exposition de ces épitopes cryptiques peut également être liée à des modifications post-traductionnelles.[52]

Il est à noter que Joly *et al*[53] ont proposé récemment **la nosologie de PTTu (unidentified TTP)**, pour les situations de PTT non héréditaire sans autoanticorps. Dans ces situations, qui sont fréquemment associées à des « comorbidités » (auto-immunité, infection, cancer…), la conformation d'ADAMTS13 est « fermée » (Figure 5). Ces cas de PTTu représenteraient jusqu'à 15% des cas de PTT chez l'adulte.

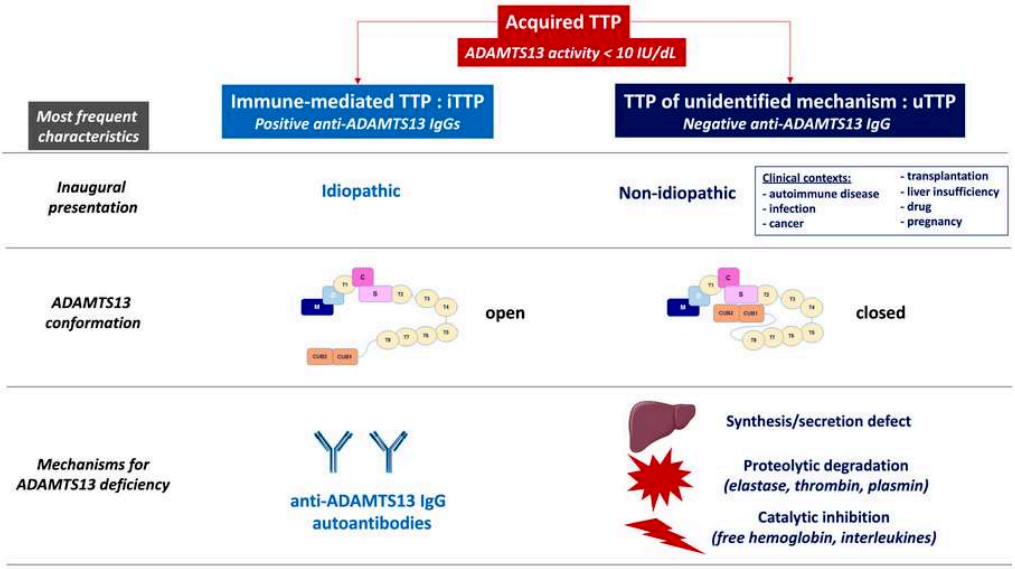


Figure 5: Le PTT acquis sans autoanticorps (adapté de Joly *et al*[53])

1.4.2 Du déficit en ADAMTS13 à la triade des MAT

En cas de libération de grandes quantités d'UL-vWF, les multimères (qui sont très prothrombotiques) sont normalement rapidement clivés par ADAMTS13. Le déficit en ADAMTS13 conduit à leur accumulation dans la microcirculation. Sous l'influence des forces de cisaillement présentes dans les vaisseaux, les sites « cryptiques » de liaison aux plaquettes (la fraction A1 du vWF, avec laquelle le Gp1b plaquettaire interagit) et le site de clivage par ADAMTS13 (fraction A2) vont être démasqués.[54,55] Les plaquettes adhèrent massivement aux UL-vWF, conduisant à la formation de thrombi diffus très riches en vWF (et non en fibrine).[56]

La formation de ces microthrombi diffus va entraîner (Figure 6) :

- Une **souffrance ischémique des organes lésés**
- Une **thrombopénie de consommation**
- Une **anémie hémolytique mécanique** (la formation des microthrombi augmente considérablement les forces de cisaillement locales,[57] conduisant à une fragmentation des globules et formant ainsi des schizocytes identifiables sur un frottis sanguin).

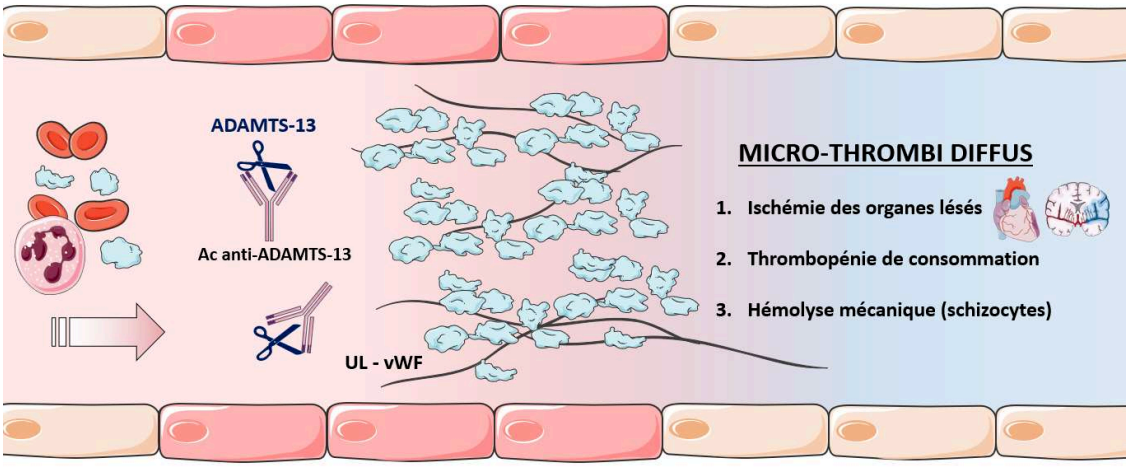


Figure 6: du déficit en ADAMTS13 à triade des MAT

1.5 Diagnostic du PTT

1.5.1 Présentation clinique et biologique du PTTi

Au moment du diagnostic, les patients présentent un **tableau souvent aigu et sévère**.[58] Historiquement, le PTT se manifestait par un pentade clinique (fièvre ou fébricule, purpura thrombopénique, anémie hémolytique mécanique, signes neurologiques et atteinte rénale), mais il est désormais rare (5%) d'avoir tous les signes lors du diagnostic, notamment l'atteinte rénale.[59] Les patients rapportent fréquemment des **prodromes** à type de syndrome pseudo-grippal dans les jours ou semaines qui précèdent le diagnostic (arthromyalgies, asthénie, douleurs abdominales et lombaires).

Les signes cliniques et biologiques de PTT sont[10,60] :

1. **Thrombopénie** : plaquettes <100 G/L, souvent <30 G/L. On retrouve fréquemment un purpura pétéchial, les manifestations hémorragiques plus sévères sont plus rares mais possibles. Le taux médian de plaquettes au diagnostic est de 16G/L.[10]

2. **Anémie hémolytique mécanique** : présence de schizocytes >2%, [*] paramètres d'hémolyse francs (LDH élevés, [†] haptoglobine effondrée, bilirubine élevée, réticulocytose). Les manifestations cliniques de cette anémie sont surtout fonction de sa rapidité d'installation, avec un syndrome anémique plus ou moins marqué (dyspnée, pâleur, tachycardie…), et éventuellement des urines foncées compte tenu de l'hémolyse intravasculaire. Le taux médian d'hémoglobine au diagnostic est 8 g/dL.[10] Une polynucléose neutrophile modérée et transitoire est fréquente.

3. **Signes cliniques « ischémiques » secondaires aux thrombi dans la microcirculation** :
   - Signes neurologiques de gravité variable chez 50 à 92% des patients : céphalées, atteinte des fonctions supérieures (confusion, obnubilation), signes focaux. L'atteinte peut être sévère, jusqu'au coma. L'imagerie cérébrale peut montrer des signes d'ischémie périventriculaire et de Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome (PRES).[61,62] Les signes hémorragiques sont rares sur l'imagerie. Rarement, les manifestations neurologiques peuvent précéder les manifestations hématologiques.[63] Les signes neurologiques s'installent souvent brutalement, sont parfois fugaces et sont volontiers fluctuants (atteinte de différents territoires).
   - Atteinte cardiaque (environ 25% des patients) : douleur angineuse, infarctus du myocarde, signes d'insuffisance cardiaque, arythmies. La mort subite reste une complication du PTT à la phase aiguë. La troponine est élevée dans 60% des cas, et un taux de troponine >10N est un facteur prédictif de morbi-mortalité.[64,65]

[*] La présence des schizocytes peut manquer au début du tableau. L'identification et la quantification sont réalisées au microscope par un biologiste médical. La recherche des schizocytes doit être répétée afin d'augmenter la sensibilité de l'examen.

[†] L'élévation des LDH est un marqueur d'hémolyse mais reflète également la souffrance ischémique des organes lésés.

- Atteinte digestive : 25% à 63% des patients ont des signes digestifs, tels que nausée, vomissements, douleurs abdominales et diarrhées. En cas de diarrhées (notamment sanglantes) précédant de quelques jours les autres manifestations de MAT, il est indispensable d'évoquer un syndrome hémolytique et urémique (SHU) typique. Des pancréatites sont également décrites.
- L'atteinte rénale est variable, et se résume souvent à une discrète élévation de la créatinine et une protéinurie modérée. L'insuffisance rénale aiguë anurique est rare, la tension artérielle est le plus souvent normale. Rappelons qu'un tableau de MAT avec une atteinte rénale sévère (typiquement avec une créatinine > 200µmol/L) évoque en premier lieu un SHU.
- De nombreuses autres atteintes d'organes ont été décrites, on notera notamment des atteintes surrénaliennes et des décollements de rétine.

Les analyses autopsiques montrent des thrombi diffus au niveau cérébral (surtout au niveau cortical), cardiaque, rénal, digestif mais également au niveau pancréatique, splénique et surrénalien. Ainsi, tous les organes peuvent être atteints,[66] mais on notera que l'atteinte pulmonaire est exceptionnelle.[67] Chez les patients âgés de plus de 60 ans, la présentation peut être atypique : confusion, troubles du comportement, moins souvent de céphalée, épilepsie, davantage d'atteinte cardiaque et rénale.[68]

1.5.2 Diagnostics différentiels

Les signes clinico-biologiques du PTT ne sont pas parfaitement sensibles ni spécifiques. Les diagnostics différentiels sont répartis en 2 catégories :

- les diagnostics différentiels des syndromes de MAT
- les MAT qui ne sont pas des PTT

1.5.2.1 Les diagnostics différentiels qui ne sont pas des MAT

1.5.2.1.1 Le syndrome d'Evans

Les bicytopénies d'origine immunologique, type syndrome d'Evans, sont un diagnostic différentiel classique du PTT.[69] Un test direct à l'antiglobuline (TDA, anciennement test de Coombs direct) est ainsi fréquemment réalisé au cours de l'évaluation diagnostic. Néanmoins, sa positivité, surtout si elle est faible, n'élimine pas le diagnostic de PTT[*]. Le syndrome d'Evans (l'association d'un purpura thrombopénique immunologique et d'une anémie hémolytique auto-immune) est aussi rare que le PTT.

1.5.2.1.2 La carence en vitamine B12

La carence en vitamine B12 peut conduire à une bicytopénie avec pseudo-schizocytose (plutôt une anisopoïkilocytose) associée à des paramètres d'hémolyse élevés (à cause de l'avortement intramédullaire des progéniteurs) et potentiellement des signes neurologiques. Néanmoins le tableau de carence en vitamine B12 est d'installation beaucoup plus progressive, et il y a typiquement un taux de réticulocytes extrêmement bas, l'anémie étant d'origine centrale. Le dosage de la vitamine B12 et la normalité d'ADAMTS13 permettent de redresser le diagnostic.[70]

1.5.2.1.3 La Coagulation Intravasculaire disséminée

La Coagulation Intravasculaire disséminée (CIVD) est une autre cause de thrombopénie de consommation, avec manifestations thrombotiques et hémorragiques. Le Temps de Prothrombine est alors diminué par consommation des facteurs de la coagulation, ce qui n'est pas le cas au cours du PTT.

1.5.2.1.4 La thrombopénie induite par l'héparine

La thrombopénie induite par l'héparine doit être systématiquement évoquée devant une thrombopénie d'apparition aiguë chez les patients traités par héparine. Elle conduit à des thromboses veineuses et artérielles des vaisseaux de moyen et gros calibres, alors que le PTT touche plutôt la microcirculation.

[*] En effet le TDA peut être positif (le plus souvent faiblement) chez 10% des PTTi. Le sepsis à pneumocoque et le lupus systémique sont 2 situations parfois associées au PTTi et dans lesquelles le TDA peut être positif.

1.5.2.1.5 Le sepsis

Le sepsis sévère qui s'accompagne d'une défaillance hématologique et souvent de défaillance d'organes peut mimer une MAT. Il existe alors fréquemment une coagulopathie associée.

1.5.2.2 Les MAT qui ne sont pas des PTT

1.5.2.2.1 Les SHU « typiques »

Le SHU dit « typique » est une microangiopathie thrombotique secondaire à une l'infection digestive par des bactéries productrices de Shigatoxine (STEC, surtout certains sérotypes de E. Coli, notamment le sérotype O157:H7 et le sérotype O26 :H11).[71] Cette toxine, dont il existe 2 formes majeures (Shigatoxine 1 et 2[*]), est composée de 2 sous-unités, la sous-unité B étant responsable d'une activation de la cellule endothéliale et la sous-unité A étant responsable d'un stress ribo-toxique conduisant à la mort de la cellule endothéliale.[†] Cette MAT touche particulièrement les enfants de moins de 5 ans. Les patients présentent un tableau inaugural diarrhéique, typiquement pendant 2 jours, avec évolution rapide vers un tableau entérohémorragique, suivi au bout de 5 à 7 jours par la triade des microangiopathies thrombotiques, l'atteinte ischémique d'organe étant très majoritairement dominée par sévère atteinte rénale sévère. Le recours à l'épuration extra-rénale est fréquent. La thrombopénie est souvent moins profonde que dans le PTT. Le dosage d'ADAMTS13 est normal ou légèrement diminué.[73] Les patients atteints lors de la récente épidémie française SHU-STEC de sérotype O26 (d'origine alimentaire) avaient des caractéristiques un peu différentes de celles retrouvées habituellement. Ils étaient globalement plus vieux (âge médian de 5 ans) et plus sévères (plus d'atteinte cardiaque et plus de recours à l'épuration extra-rénale). Pendant l'épidémie allemande d'E. Coli O104:H4 en 2011, 2 patients avaient aussi des auto-Ac anti-ADAMTS13,[74] suggérant un effet déclenchant de la Shigatoxine peut-être par l'induction de la dégranulation des CWP. La Shigatoxine peut se fixer entre le domaine A1 et le domaine A2 d'ADAMTS13, diminuant son activité enzymatique.[75] Il semble qu'un tableau de SHU se développe chez 15 à 20% des enfants infectés par le STEC (les moins de 5 ans étant les plus à risque). Les SHU typiques sont plus fréquemment sévères chez les adultes, avec des formes cardiaques et neurologiques.

[*] La Shigatoxine (Stx) 2 est responsable de la majorité des SHU. Le sérotype O157 :H7 produit toujours de la Shigatoxine 2, mais d'autres sérotypes le peuvent aussi. Dans une récente dans le NEJM,[72] Freedman *et al* proposent les critères suivants pour identifier les infections à STEC à haut risque de SHU : identification du sérotype O157:H7 ou histoire de diarrhée sanglante ou présence de Shigatoxine 2 (identification de l'antigène ou identification du gène par PCR).

[†] Après ingestion de STEC qui prolifèrent, sécrètent la Shigatoxine et lésent la muqueuse digestive, le patient développe un tableau digestif (diarrhée sanglante notamment). La Shigatoxine est transloquée dans la circulation (forme soluble et forme vésiculaire). La shigatoxine peut se fixer sur son récepteur Gb3 (l'endothélium rénal est particulièrement riche en Gb3), le complexe Gb3-Stx est internalisé et conduit au réticulum endoplasmique de manière rétrograde dans l'appareil de Golgi. La shigatoxine est protéolysée, et le fragment actif de la sous-unité A clive une adénine dans l'ARN 28S, empêchant la synthèse protéique (stress ribotoxique).

1.5.2.2.2 Les SHU « atypiques »

Le SHU dit « atypique » est une microangiopathie thrombotique liée à une activation dérégulée de la voie alterne du complément, secondaire à différents mécanismes notamment[1,76] :

- Des mutations « gain de fonction » des gènes codant pour des protéines activatrices, telles que le C3 et CFB
- Des mutations « inactivatrices » des gènes codant pour des protéines régulatrices, telles que le CFH, le CFI, CD46, et de manière plus discutée la thrombomoduline
- Des auto-anticorps anti-CFH

Le SHU atypique est un modèle de « complémentopathie » et permet d'éclairer le rôle du complément dans d'autres MAT, point que nous discuterons dans la 3ème partie de cette introduction bibliographique. La classification usuelle des SHU est présentée Figure 7.

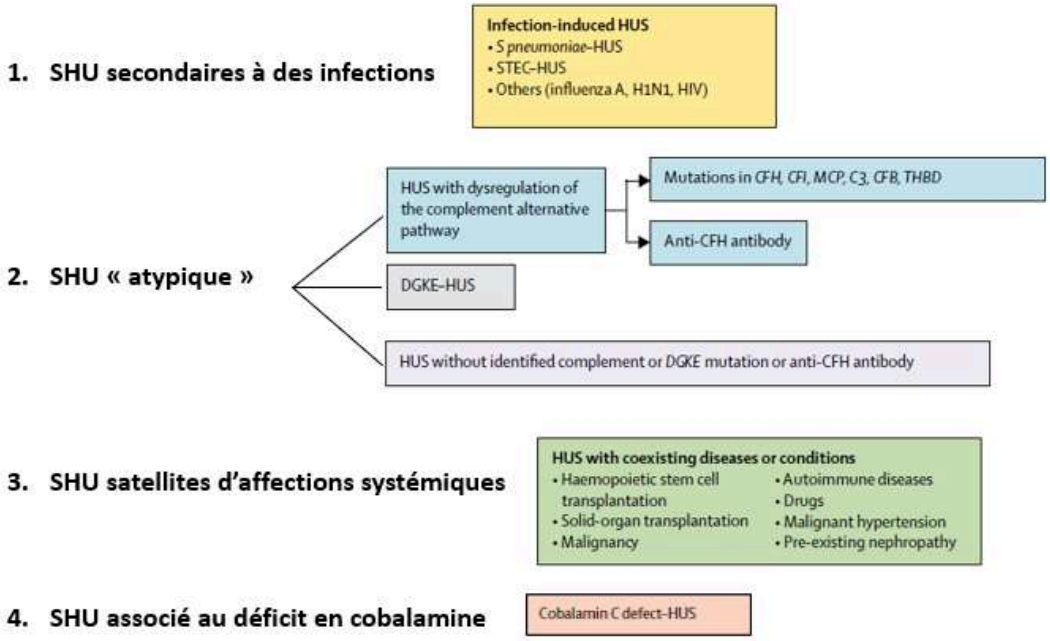


Figure 7: Classification des SHU (adapté de Fakhouri *et al*, Lancet 2017)

1.5.2.2.3 MAT induites par des médicaments

De nombreux médicaments peuvent induire des MAT, qui sont habituellement plus proches du SHU que du PTT. On peut notamment citer les anti-calcineurines, la mitomycine C, la gemcitabine, les anti-VEGF, la quinine.[60] Il n'existe en général pas de déficit en ADAMTS13 associé, à l'exception du PTT induit par la ticlopidine (anti-agrégant plaquettaire de la famille des thienopyridine, rarement utilisé), qui conduit à l'apparition d'auto-anticorps responsables d'un déficit sévère en ADAMTS13.[77] Des cas de PTT auto-immuns ont également été décrits avec les check-points inhibiteurs, dont le mécanisme d'action conduit fréquemment à une auto-immunité iatrogène. Notons que le nombre déclaré de MAT induit par des médicaments (notamment les nouvelles thérapies anticancéreuses) semble en augmentation rapide.[78]

1.5.2.2.4 MAT associées à la transplantation de cellules souches

Il n'y a pas habituellement pas de déficit en ADAMTS13 dans les MAT associées à la greffe de cellules souches et aux cancers.[60] L'agression endothéliale par les chimiothérapies, l'irradiation et la *Graft versus Host Disease* (GVHD) a probablement un rôle pathogénique majeur,[79] c'est la raison pour laquelle ces MAT sont abordées plus en détail dans la partie 3.5 de cette introduction bibliographique.

1.5.2.2.5 MAT associées aux cancers disséminés ou une chimiothérapie

Les patients atteints de cancer peuvent développer des tableaux de MAT. Il s'agit essentiellement d'adénocarcinomes (gastrique, pulmonaire, prostatique, mammaire), le plus souvent métastatiques (notamment avec des métastases médullaires, identifiables par un myélogramme comme présenté en Figure 8). En cas de cancer actif traité, il n'est pas aisé de différencier une MAT paranéoplasique d'une MAT post-chimiothérapie, certains éléments permettent néanmoins d'aider l'orientation diagnostique (Figure 9).

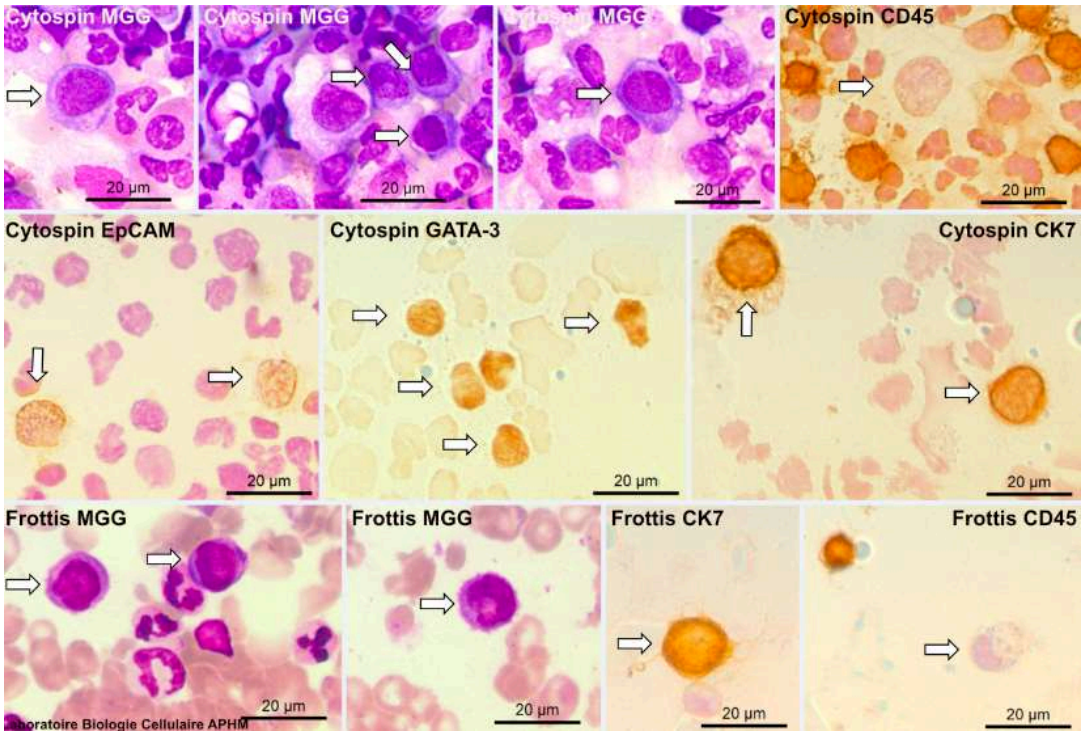


Figure 8: Cytologie médullaire mettant en évidence des cellules carcinomateuses, chez une patiente prise en charge pour une MAT sévère.

	MAT post-chimiothérapie	MAT paranéoplasique
AEG, douleurs osseuses	0	+++
HTA	+++	0
Signes respiratoires	++	+
Insuffisance rénale	++	±
ADAMTS13	Normale/détectable	Normale/détectable
Dacryocytes Erythroblastes	0	+++
CIVD	0	++
Traitement	Stop chimio	Débuter chimio

Figure 9: Eléments permettant de discriminer les MAT post-chimiothérapie des MAT paranéoplasiques (adapté de Grangé *et al*[80])

1.5.2.2.6 MAT satellites de l'infection par le VIH

La prévalence des MAT satellites de l'infection par le VIH est très variable en fonction de la zone géographique considérée.[81] C'est de loin la première cause de MAT en Afrique du Sud, tandis qu'elle est rare en Europe lorsque les patients sont traités par trithérapie antirétrovirale.[82] Une étude prospective française permet schématiquement de distinguer deux types de MAT satellites de l'infection par le VIH[83] :

- Une forme authentique de PTT auto-immun probablement déclenché par le VIH, avec une ADAMTS13 <5%. Cette forme est associée à un taux de CD4+ plus élevé et à un nombre inférieur de complications du VIH, avec un pronostic globalement meilleur.
- Une forme de MAT apparaissant dans un contexte de SIDA (et possiblement secondaire aux co-infections), avec un dosage ADAMTS13 >5%, et grevée d'un pronostic sombre. Ce type de microangiopathie est probablement secondaire à l'immunodépression majeure et aux infections angio-invasives.

1.5.2.2.7 MAT satellites de connectivites

Des MAT ont été décrites compliquant le lupus érythémateux systémique, la polyarthrite rhumatoïde et la sclérodermie systémique, avec souvent la présence d'auto-anticorps anti-ADAMTS13.[24] On notera par ailleurs que la crise rénale sclérodermique et le Syndrome Catastrophique des Antiphospholipides (CAPS) constituent des formes de microangiopathies thrombotiques et seront abordés plus loin.

1.5.2.2.8 MAT associées à la grossesse

La prééclampsie et le HELLP syndrome (Haemolysis, Elevated Liver enzyme, Low Platelets) sont des entités parfois difficiles à distinguer du PTT. Ces deux syndromes apparaissent au 3ème trimestre de la grossesse (typiquement après la 34ème semaine), et sont rapidement résolutifs après l'accouchement.[84] Dans la prééclampsie, il existe souvent une HTA plus sévère et des œdèmes des membres inférieurs, tandis qu'il existe un atteinte hépatique marquée dans le HELLP, ces éléments ne faisant pas partie du tableau habituel de PTT. L'activité ADAMTS13 est normale ou légèrement diminuée, mais il semble que le vWF soit en conformation « ouverte », favorisant l'interaction du domaine A1 avec la Gp1b plaquettaire. Il est classique que le syndrome d'Upshaw-Schulman soit découvert lors d'une première poussée au cours de la grossesse.[85] Un PTT survenant durant une grossesse est associé à une

perte du fœtus dans 40% des cas.[86] En cas de survenant au cours de la grossesse, le pronostic fœtal est mauvais.

1.5.2.2.9 MAT associée aux crises hypertensives

Les tableaux d'hypertension artérielle sévère peuvent se compliquer de microangiopathie thrombotique. Néanmoins il peut être difficile de différencier une HTA maligne compliquée de MAT rénale, d'un SHU atypique compliqué d'hypertension artérielle.

1.5.3 L'importance d'un score prédictif

Le résultat des dosages de l'activité ADAMTS13 et des Ac anti-ADAMTS13 étant longs à obtenir en routine (en règle générale entre 24h et 72h), il est nécessaire d'avoir un diagnostic présomptif pour commencer à traiter les patients dont l'état est souvent critique lors de la présentation initiale. Les deux scores les plus fréquemment utilisés sont le French Score et le PLASMIC score (Figure 10). Globalement ces 2 scores montrent qu'en présence d'un tableau de MAT sans contexte associé (cancer ou chimiothérapie, grossesse, sepsis, CIVD), la présence d'une thrombopénie profonde (< 30 G/L) et d'une atteinte rénale absente ou modérée (Créatinine <200 µmol/L), le PTT est très probable. Les performances diagnostiques sont régulièrement discutées dans la littérature, notamment sous leurs formes modifiées (ex : adjonction des LDH ou de la protéinurie au Plasmic score). Notons qu'il a été décrit que ces scores étaient moins performants dans les populations plus âgées (> 60 ans).[68,87]

Paramètres	French score	PLASMIC score
Plaquettes	< 30 Giga/L (+1)	< 30 Giga/L (+1)
Créatinine sérique	<2,26 mg/dL (+1)	<2,0 mg/dL (+1)
Hémolyse Bilirubine libre > 2 mg/dL ou réticulocytes >2,5% ou haptoglobine indétectable	a	+1
Pas de cancer évolutif sur l'année passée	a	+1
Pas de contexte de transplantation d'organe ou de cellules souches	a	+1
INR <1,5	a	+1
VGM <90 fl	a	+1
Probabilité d'un déficit sévère (<10%) en ADAMTS13	**0 : 2%** **1 : 70%** **2 : 94%**	**0-4 : 0-4%** **5 : 5-24%** **6-7 : 62-82%**

Figure 10 : Scores de prédiction d'un déficit en ADAMTS13 (PNDS 2023).

1.5.4 La confirmation du diagnostic

Il est nécessaire d'avoir un dosage de l'activité ADAMTS13 effondrée (<5%) pour retenir le diagnostic de PTT[*]. Le **Gold-Standard est le FRET-Assay** (fluorescence resonance energy transfer), qui quantifie l'activité ADAMTS13 en utilisant son substrat minimal, composé de 73 acides aminés compris dans le fragment A2 du vWF.[88] Chez les patients très hémolytiques ayant un taux de bilirubine libre très élevé, le dosage de l'activité ADAMTS13 peut être artificiellement bas.[89] A Marseille, le laboratoire utilise en routine la technique **AcuStar®**.[†] Lorsque la suspicion clinique de PTT est faible, il est préférable de contrôler le prélèvement à l'aide de la méthode de référence (FRET assay).[90] L'activité ADAMTS13 peut être diminuée de manière modérée (>10%) dans des conditions pathologiques telles que le sepsis, les cancers métastatiques, la CIVD et l'insuffisance hépatocellulaire. Elle baisse physiologiquement au cours de la grossesse, avec un minimum d'activité dans les dernières semaines.[91] Enfin, il semble que l'activité ADAMTS13 puisse être diminuée par un mécanisme de « consommation » de l'enzyme lorsque les multimères de vWF augmentent dans la microcirculation, par exemple chez les patients traités par Desmopressine.[92]

Le caractère auto-immun du PTT est affirmé par la présence d'Ac anti-ADAMTS13 à un taux significatif. Les IgG anti-ADAMTS13 sont aujourd'hui essentiellement dosées par technique ELISA, en utilisant l'ADAMTS13 comme antigène immobilisé. Le dosage de « l'antigène ADAMTS13 », qui pourrait avoir un rôle pronostic,[93] est également possible en ELISA, mais n'est pas réalisé en routine car peu pertinent pour le diagnostic de PTT.

Le PTT congénital, beaucoup plus rare nécessite pour être diagnostiqué de :

- Confirmer le déficit en ADAMTS13 <10%,
- L'absence d'auto-anticorps anti-ADAMTS13
- La confirmation de l'existence de variants pathogène du gène *adamts13* (homozygote ou hétérozygote composite)

[*] Ce dosage doit être réalisé avant l'initiation des échanges plasmatiques

[†] Il s'agit d'un dosage immunologique en 2 étapes conçu pour quantifier l'activité ADAMTS13 dans le plasma humain citraté, à l'aide de particules magnétiques en phase solide et d'un système de détection en chimiluminescence. L'échantillon est incubé avec le tampon de dosage et des particules magnétiques recouvertes du substrat peptidique GST-vWF73 (qui est un peptide recombinant correspondant au substrat minimal pour le clivage par ADAMTS13). L'ADAMTS13 présente dans l'échantillon clive alors le substrat lié aux particules magnétiques. Le peptide clivé après le 10ème acide aminé est quantifié à l'aide d'un anticorps spécifique, couplé à l'isoluminol, permettant la réaction de chimioluminescence après l'addition du déclencheur. L'automate exprime la lumière émise en unités relatives (RLUs). Les RLUs sont directement proportionnels à l'activité ADAMTS13 de l'échantillon testé.

1.6 Marqueurs pronostiques et facteurs de gravité

L'histoire naturelle du PTT est dramatique : sans traitement, 90% des patients évoluent vers un syndrome de défaillance multiviscérale mortel dans les 2 semaines qui suivent le diagnostic. Il existe un risque de mort subite avant l'instauration du traitement. Différents facteurs ont été associés à la mortalité[94]: les atteintes cardiaques et cérébrales, un taux de LDH > 10N et un âge >60 ans.

Les thromboses artérielles, l'atteinte rénale ou neurologique ont également été associés à la mortalité. La principale cause de décès des patients à la phase aiguë du PTT est l'ischémie myocardique.[95,96] Un taux sérique de troponine-I >0,25 µg/L au diagnostic de la maladie constitue ainsi un facteur de risque indépendant de décès.[97] Par ailleurs, les traitements actuels, en améliorant grandement la mortalité initiale du PTT, ont transformé cette maladie aiguë en une pathologie chronique marquée par la survenue de rechutes tardives. Cela fait du PTT une pathologie thrombotique récidivante exposant les patients à des séquelles ischémiques myocardiques graves pouvant toucher jusqu'à 25% des malades.[98] Par ailleurs, si un âge > 60 ans est associé à la mortalité, un âge plus jeune semble associé au risque de récidive.[99] La Figure 11 reprend une table des facteurs pronostiques identifiés dans la littérature scientifique par Scully *et al* (BJH 2023).

Parameter	Detail	Data/Finding	Reference
Age[101,102]	>60 vs. <40 vs. <45 years	>60 independently associated with increased mortality (OR 10.6 [95% CI = 2.0–32.0] vs. age <40; adjOR 3.47, [95% CI = 2.14–5.63] vs. age <45)	Benhamou et al. (2012); Goel et al. (2016)
Age[103]	Younger age	Younger age was also predictive of relapse	Jin et al. (2008)
Ethnicity[104,105]	Caucasian vs. non-Caucasian	African-American patients at less risk of dying, compared to Caucasian counterparts on multivariate analysis (OR = 0.2, [95% CI = 0.03–0.74])	Cataland et al. (2009); Martino et al. (2016)
Presenting features[101,102,104]	Arterial thrombosis	Arterial thrombosis (adjOR 6.73, 95% CI = 1.11–40.91)	Benhamou et al. (2012); Goel et al. (2016); Martino et al. (2016)
Presenting features[101,102,104]	Renal dysfunction/failure	Renal failure (adjOR 2.56, 95% CI = 1.46–4.47)	Benhamou et al. (2012); Goel et al. (2016); Martino et al. (2016)
Presenting features[101,102,104]	Neurological involvement	Neurological involvement, both specific pathologies; ICH (adjOR 6.05, 95% CI = 1.58–23.24) and ischaemic stroke (adjOR 2.42, 95% CI = 1.17–5.01) (both these predict mortality on multivariate analysis); and symptoms, involvement headache, focal impairment, stupor and seizure (OR 2.6 [1.0, 6.9] $p = 0.05$; OR = 3.43 [95% CI = 1.2–12.4] $p < 0.05$)	Benhamou et al. (2012); Goel et al. (2016); Martino et al. (2016)
Blood tests[103]	ADAMTS13 activity	Three months after initial diagnosis ADAMTS13 activity may also predict risk of relapse	Jin et al. (2008)
Blood tests[26,108]	ADAMTS13 antibody	Anti-ADAMTS13 antibodies and mortality: higher anti-ADAMTS13 antibody titres in patients who died compared to those who survived (anti-ADAMTS13 antibody titre >2 Bethesda units), particularly when high titres were associated with a low ADAMTS13 antigen (ADAMTS13 antibody >77% and ADAMTS13 antigen <1.5%, and either of anti-ADAMTS13 antibody >77% or ADAMTS13 antigen, 1.5% but not both, mortality was 27.3% and 10.2% respectively, $p = 0.02$)	Alwan et al. (2017); Kremer Hovinga et al. (2010)
Blood tests[105]	ADAMTS13 antigen	ADAMTS13 antigen <1.5% (lowest quartile) and antigen >10% (highest quartile) have been shown to be associated with mortality of 184% and 3.8% respectively ($p = 0.005$) ADAMTS13 antigen at presentation may predict mortality and at time of clinical recovery, predict relapse ($p = 0.03$; $p = 0.19$ respectively)	Cataland et al. (2009)
Blood tests[101]	LDH	LDH 10× normal (OR 3.0 [1.3, 11.6] $p = 0.014$) The speed of decline in LDH levels in response to treatment predicts mortality: A rapid reduction in LDH correlated with survival and failure to significantly reduce serum LDH by day 5, which persisted on Cox regression analysis (elevated LDH at day five [HR 2.93, $p = 0.04$]), predicted mortality	Benhamou et al. (2012) Patton et al. (1994)
Blood tests	Platelet recovery rate	Platelet recovery rate overall was associated with improved survival on multivariate analysis (platelet recovery rate 5×10^9/L per 24 h OR 18.3 CI 95% [3.7–91.4] $p < 0.001$) On univariate, the normalisation of the platelet count within 7 days was associated with clinical remission ($p < 0.001$)	Staley et al. (2019)
Blood tests	Total protein/albumin	Raised total serum protein or albumin on admission and reduced risk of in-hospital mortality (HR, 0.37 [$p = 0.032$]; HR, 0.21 [$p = 0.003$] respectively)	Staley et al. (2019)
Blood tests[107]	Troponin	A high troponin on multivariate analysis; • mortality (OR 2.39 [95% CI 1.02–5.63] $p = 0.046$ OR 2.87; 95% confidence interval [CI] 1.13–7.22; $p = 0.024$) • refractoriness (OR 3.03 [95% CI 1.27–7.3] $p = 0.01$)	Brazelton et al. (2017)

Figure 11: Facteurs pronostiques identifiés dans la littérature scientifique par Scully *et al*, BJH 2023 (essentiellement issus de l'ère pré-Caplacizumab)

1.7 Prise en charge du PTT auto-immun

1.7.1 Prise en charge initiale

1.7.1.1 Considérations générales et terminologie

Dès que le diagnostic est considéré comme suffisamment probable par le clinicien, le **traitement doit être instauré en urgence**. La prise en charge initiale ne peut s'envisager qu'en milieu hospitalier. L'idéal est que le patient soit hospitalisé dans un service en lien avec le centre national de référence ou avec les centres régionaux de compétence. **Une prise en charge initiale en unité de soins intensifs est souhaitable**, car l'état clinique des patients peut s'aggraver brutalement, surtout avant l'instauration des échanges plasmatiques. Une bonne coopération entre spécialistes des MAT (hématologues, internistes, néphrologues…) et réanimateurs est indispensable à la prise en charge des patients.

En l'absence de saignement menaçant le pronostic vital immédiat (situation exceptionnelle dans un contexte de PTT), la **transfusion de concentrés plaquettaires est contre-indiquée**, car elle entretient et même aggrave la formation des thrombi dans la microcirculation. Malheureusement une proportion non négligeable de patients reçoit des transfusions de culots plaquettaires avant que le diagnostic soit évoqué, parfois au prix d'une dégradation clinique fatale.

Un groupe international d'experts[100] a récemment « standardisé » la dénomination des différentes évolutions cliniques qui suivent l'introduction du traitement :

- **Réponse clinique** : plaquettes >150 G/L à 2 reprises et LDH <1.5 N, sans nouvelle atteinte ischémique d'organe
- **Rémission clinique** : réponse clinique sans échange plasmatique depuis plus de 30 jours[*]
- **Rémission complète** : rémission clinique avec normalisation d'ADAMTS13
- **Exacerbation** : récurrence (plaquettes <150 G/L) durant les 30 jours après rémission clinique
- **Rechute** : récurrence (plaquettes >150 G/L) après les 30 jours suivant une rémission clinique
- **Réfractaire** : pas de réponse clinique malgré 30 jours de traitement[†]

[*] Les auteurs précisent que cette définition ne tient pas compte de l'effet temporaire du traitement anti-vWF sur la numération plaquettaire, et si le traitement anti-vWF est interrompu avant la normalisation de l'activité ADAMTS13

[†] Cette situation est devenue plus rare depuis l'avènement du caplacizumab

1.7.1.2 Plasmathérapie

Les **échanges plasmatiques** (EP) à grand volume ont transformé le pronostic du PTT, en diminuant la mortalité à 2 semaines de 90% à 10-20%. L'effet des EP est essentiellement d'apporter de l'ADAMTS13 au patient[*]. Les EP au cours du PTT ont certaines caractéristiques :

- Ils doivent être initiés en **urgence**.
- Ils se font à **grands volumes** (1.5 masse plasmatique, soit environ 60 mL/kg).
- Ils sont quotidiens, jusqu'à normalisation des plaquettes (> 150 G/L deux jours d'affilée)[†].
- Etant donné que l'effet attendu des EP est l'apport d'ADAMTS13, **le produit de substitution est du plasma de donneur** (à l'inverse des échanges plasmatiques pour la plupart des autres indications, pour lesquelles le produit de substitution est de l'albumine. On peut prescrire indifféremment le plasma frais congelé viro-sécurisé et les plasmas viro-inactivés par solvant/détergent (plasma médicament) ou psoralène/UV.
- On privilégie les voies d'abords veineuses périphériques, mais la pose d'un cathéter veineux central est parfois indispensable.

Si les EP sont impossibles, il faut réaliser des perfusions de plasma à grands volumes (20 mL/kg). Les EP ont fait la preuve de leur supériorité par rapport aux transfusions de plasmas au cours d'un essai contrôlé randomisé en 1991.[101] Une intensification du traitement par EP biquotidiens a été proposée pour les cas les plus sévères.[102] Pour le traitement du PTTc, les transfusions de plasmas peuvent être suffisantes.[‡]

1.7.1.3 Rituximab

Le Rituximab est un anticorps monoclonal **anti-CD20** chimérique qui a été utilisé dans le PTT initialement pour les patients en réponse suboptimale,[106,107] c'est-à-dire pour ceux avec récidive de la thrombopénie durant la période des EP (ou moins de 30 jours après l'arrêt des échanges) ou pour les patients réfractaires aux échanges.

Deux études prospectives ont testé le **Rituximab en *frontline* pour tous les patients** et ont montré que le Rituximab était associé à des rechutes moins fréquentes et moins rapides, suggérant de traiter tous les patients par Rituximab en première intention.[108,109] Le Rituximab permet une normalisation plus rapide de l'activité ADAMTS13 et permet la négativation des Ac anti-ADAMTS13.[110] Une méta-analyse a confirmé le bénéfice d'un traitement par Rituximab (notamment sur la mortalité) chez tous les patients avec un PTTi.[111] Ce traitement est globalement sûr et bien toléré.[109] Un protocole fréquemment utilisé est 1 injection hebdomadaire de Rituximab 375 mg/m² pendant 4 semaines.[11] De nouvelles injections sont

[*] Il a été évoqué (sans démonstration formelle) qu'un effet des EP pourrait également s'expliquer par la soustraction des UL-vWF, des Ac anti-ADAMTS13, et de cytokines inflammatoires tels que le C3a et le C5a.

[†] Avant l'aire du Caplacizumab, les patients atteints de PTTi pouvaient nécessiter des dizaines d'EP quotidiens, voire biquotidiens. Cette situation est devenue rare depuis.

[‡] Des équipes réalisent pour les patients de PTT congénital des perfusions prophylactiques de plasma (par exemple 10-15 mL/kg/15j), avec un effet potentiel sur des symptômes d'ischémie subaiguë (sans réel épisode de PTT).[103] Des administrations de concentrés de facteur VIII (contenant de l'ADAMTS13) à la dose de 15-30 U/kg/semaine sont également possibles.[104,105]

possibles en cas de non-correction du déficit. Le protocole est fréquemment « adapté » si les injections de Rituximab ont lieu durant les échanges plasmatiques (ex : J1-J4-J8-J11).[112] Le traitement doit, si possible, être initié dans les 3 premiers jours suivant le début du PTT.[90]

1.7.1.4 Caplacizumab

Le caplacizumab est un **nanocorps** bivalent de 28 kDa composés de 2 domaines variables de chaînes lourdes d'immunoglobuline, et **ciblant le domaine A1 du vWF**, bloquant ainsi l'interaction avec le Gp1b-IX-V plaquettaire et inhibant ainsi la formation des microthrombi. La première dose (10 mg) est administrée sous forme intraveineuse avant le premier EP, suivie d'injections de 10 mg quotidiennes par voie sous-cutanées.[*] La demi-vie du caplacizumab est d'environ 24h, et son élimination est en partie rénale.[114] La **précocité** de son administration semble importante au cours de la prise en charge des patients. A l'heure actuelle, le caplacizumab n'est pas recommandé chez la femme enceinte.[†]

L'approbation de la FDA (Food and Drug Agency) et de l'EMA (European Medicines Agency) s'est appuyée sur les données des essais **TITAN**[12] (essai de phase 2) et **HERCULES**[116] (essai randomisé international en double aveugle). HERCULES et TITAN ont tous deux démontré que l'ajout du caplacizumab au traitement standard composé d'échanges plasmatiques et de stéroïdes (avec ou sans autre immunosuppresseur), conduisait à des taux plus élevés de rémission complète et à une réduction des exacerbations. Un résultat composite comprenant le taux d'exacerbation et de rechute du PTT, le décès lié au PTT et les évènements macro-thrombotiques était significativement plus bas dans le groupe caplacizumab que dans le groupe placebo (12.7 vs 49.3%). Les essais ont également démontré une réduction de la durée du séjour à l'hôpital et en unité de soins intensifs, ainsi que de la durée et du volume de plasma nécessaire. Ces résultats ont été confirmés en vie réelle à de multiples reprises.[117–119] Le caplacizumab est théoriquement prescrit une durée jusqu'à 30 jours après le dernier échange plasmatique, et peut être continué si l'activité ADAMTS13 n'est pas corrigée. La durée « maximale » de maintien du caplacizumab n'est pas définie et est une problématique clinique récurrente.[‡] En cas de correction de l'activité ADAMTS13 > 20% (>30% au Royaume-Uni), il est usuel d'arrêter le caplacizumab avant les 30 jours initialement prescrits.[119] De manière imagée, on peut considérer que le caplacizumab est un « pont » entre les EP et l'efficacité du Rituximab.

L'effet indésirable principal du caplacizumab est l'apparition de **saignements**, essentiellement muqueux (gingivorragie, épistaxis) et cutanés (ecchymoses notamment au point d'injection), qui touchent presque 35% des patients.[§] Le traitement provoque en effet une « maladie de Willebrand de type 2M iatrogène ». Des réactions inflammatoires aux points d'injection sont également rapportées, notamment en cas de prescription prolongée. Un autre inconvénient de ce produit est son **coût très élevé** : plusieurs milliers d'euros pour

[*] Chez les patients de moins de 40kg, une dose de 5 mg est préconisée.[113]

[†] Des observations suggèrent néanmoins que son utilisation soit possible dans cette population.[115]

[‡] Une équipe a montré que, de manière assez inattendue, le délai de normalisation de l'activité ADAMTS13 serait augmenté depuis l'utilisation systématique de Caplacizumab.[120] Ces données ne semblent pas être confirmées par les autres centres.

[§] Les accidents hémorragiques sévères sont rares (environ 2%) sous caplacizumab. Des concentrés de vWF ont été proposés pour « antagoniser » (ou saturer) le produit.[116]

chaque injection. Malgré son coût élevé, le rapport coût-efficacité semble favorable : ceci est lié notamment à la diminution du nombre d'EP et à la diminution de la durée d'hospitalisation.

Peut-on se passer des EP dans certains cas peu sévères (défaillance hématologique sans signe ischémique majeur) ? Certaines observations le suggèrent[116,121] et un essai international est en cours (essai MAYARI) pour apporter des éléments de réponse plus robustes à cette question.

1.7.1.5 Mesures adjuvantes

Corticothérapie : les corticoïdes sont prescrits dans le PTTi compte tenu du mécanisme auto-immun conduisant au déficit en ADAMTS13. Ils permettent de réduire le nombre de séances d'EP, et augmentent le taux de réponse à 3 semaines. Un essai contrôlé randomisé semble en faveur d'un usage de fortes doses de méthylprednisolone par rapport à des doses standard de prednisone.[122] Néanmoins l'usage est d'administrer une corticothérapie initiée à 1 ou 1,5mg/kg/j en décroissance rapide sur 3 semaines. L'administration des corticoïdes doit préférentiellement se faire après les séances d'échanges plasmatiques.

Vitamines B9 : compte tenu de l'hémolyse parfois massive et donc de la nécessité d'une importante activité médullaire compensatrice, de l'acide folique est administré de manière systématique.

Transfusions de concentrés érythrocytaires : elles sont parfois nécessaires lorsque l'anémie est profonde ou mal tolérée.

Anticoagulation préventive : les patients, fréquemment hospitalisés en réanimation et porteurs de cathéters centraux, ne sont la plupart du temps pas anticoagulés compte tenu de la thrombopénie profonde et du risque hémorragique associé. Néanmoins, la fréquence des évènements thromboemboliques veineux est probablement sous-estimée (13% dans une série française) et pose le problème ensuite d'une anticoagulation efficace associée au caplacizumab.[123] Le mécanisme d'action du caplacizumab ne protège pas contre les thromboses veineuses. Ainsi le PNDS français et les recommandations britanniques proposent d'initier une anticoagulation préventive dès que le taux de plaquettes est supérieur à 50G/L.[90] Un poster sur cette thématique a été présenté au congrès de la Société Française d'Hématologie en 2020 (Annexe 1).

1.7.1.6 Une ADAMTS13 recombinante pour l'avenir ?

Une thérapie actuellement à l'étude est l'ADAMTS13 recombinante, qui est produite dans des cellules ovariennes de hamster chinois,[124] et qui permettrait théoriquement de limiter le recours aux EP et le coût et la iatrogénie qui y sont associés. Dans le PTTi, des travaux sont en cours pour développer une ADAMTS13 recombinante qui ne soit pas reconnue par les auto-anticorps (par exemple par l'insertion d'un N-Glycan dans le domaine spacer).[125,126]

1.7.2 Quelle gestion de la persistance du déficit en ADAMTS13 ?

Malgré l'utilisation du Rituximab en *front-line*, tous les patients ne corrigent pas leur activité ADAMTS13[*]. A notre connaissance, il n'existe **pas de recommandation officielle** sur l'attitude thérapeutique à adopter dans ces cas. Nous mentionnons ci-dessous à titre indicatif les options qui sont parfois proposées :

- Une ou plusieurs cures de Rituximab de « consolidation » sont parfois proposées
- Ciclosporine, qui semble assez efficace, mais dont l'effet semble essentiellement suspensif et dont le profil de tolérance est parfois mauvais, notamment chez les plus âgés.[†]
- **L'Obinutuzumab** (GA101), un anti-CD20 humanisé plus récent, semble prometteur. Ce médicament est utilisé en cas d'anaphylaxie ou de maladie sérique liée au Rituximab.
- Des thérapies anti-plasmocytaires (Daratumumab[127], Bortezomib[128]) ont été essayées chez les patients. Des études prospectives sont nécessaires.
- La splénectomie, qui est rarement proposée[‡].

Ces cas doivent autant que possible faire l'objet de réunions de concertation pluridisciplinaire avec le CNR-MAT.

[*] On attend classiquement 2 mois après l'initiation du traitement par Rituximab pour parler d'échec quant à la normalisation de l'activité ADAMTS13.

[†] A noter qu'un essai prospectif randomisé comparant la corticothérapie à la ciclosporine à la phase aiguë du PTT a montré une supériorité de la corticothérapie quant à la normalisation d'ADAMTS13 et la baisse des auto-anticorps.

[‡] Envisager une chirurgie viscérale alors que l'activité ADAMTS13 est effondrée est une situation qui semble à risque.

1.8 Evolution à long terme

1.8.1 Les rechutes

Si des mesures préemptives ne sont pas proposées au patient, le risque de rechute est important (40% à 1 an, 74% à 7 ans). On distingue :

- **Les rechutes cliniques** (nouvel épisode de PTT)
- **Les rechutes « ADAMTS13 »,** c'est-à-dire une activité de l'enzyme baissant à nouveau (souvent associée à une réascension du titre des Ac anti-ADAMTS13). La rechute ADAMTS13 expose bien sûr au risque de rechute clinique. Une attitude de **traitement « préemptif »** est donc recommandée en cas de baisse de l'activité ADAMTS13 <20%.[129] Elle consiste en l'administration d'une cure unique de Rituximab. Un traitement « intensif » a également été proposé.[130]

Ce risque de rechute impose un **suivi à vie** des patients (les rechutes pouvant survenir plus de 10 ans après le premier épisode), idéalement tous les 3 mois initialement et parfois allégé à une fois tous les 6 mois en cas de stabilité pendant des années. A chaque suivi, l'activité ADAMTS13 et le taux d'Ac anti-ADAMTS13 sont mesurés.

1.8.2 Complications du traitement immunosuppresseur

Le traitement immunosuppresseur par Rituximab est indiqué chez tous les patients avec un PTTi, ces derniers développent donc une **immunodépression humorale iatrogène**. Les vaccinations antigrippales et antipneumococciques doivent être réalisées,[*] ainsi qu'une surveillance régulière du taux de gammaglobulines. De plus, une phénotypage lymphocytaire pour quantifier les lymphocytes B est souvent réalisé dans le suivi.

1.8.3 L'auto-immunité associée

Les **maladies auto-immunes systémiques** surviennent chez environ 10% des patients à 10 ans de suivi, notamment le lupus érythémateux systémique et le syndrome de Sjögren, plus rarement la sclérodermie systémique. Certaines séries japonaises montrent une association avec la maladie de Still.

[*] La vaccination antipneumococcique peut cependant être moins efficace en aigu compte tenu de l'utilisation concomitante du Rituximab. Une vaccination à distance (6 mois) du Rituximab est parfois réalisée.

1.8.4 Les séquelles du PTT

Le taux de mortalité ayant diminué, il est maintenant connu que le PTT est une **maladie chronique**. Les séquelles du ou des épisodes de PTT ont probablement été sous-estimées par le passé, et sont maintenant bien documentées :

- Il existe des **séquelles neurocognitives** chez 50-88% des patients, de sévérité variable, avec notamment des troubles du langage (manque du mot), de l'attention, de la dextérité et de la mémoire.[*] Ces troubles sont probablement en partie liés à l'ischémie cérébrale, parfois silencieuse (*Silent Cerebral Infarction*).[132] Les patients en rémission ont un risque d'AVC ischémique 5 fois supérieur à la population générale, notamment ceux qui sont en rémission ayant une activité ADAMTS13 <70%.[133]
- Il existe des taux élevés de **dépression** et de symptômes anxieux, avec une altération de la qualité de vie.[134,135]
- Le tropisme **cardiaque** du PTT impose également une prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaire et un suivi cardiologique.[98] Les maladies cardiovasculaires sont une des premières causes de mortalité 1 an après l'épisode aigu.

[*] L'étude de Han *et al*[131] rapporte plutôt la proportion de 27% de persistance de troubles cognitifs malgré la rémission

2. L'endothélium

2.1 Présentation générale

L'endothélium constitue une monocouche de cellules pavimenteuses tapissant la paroi interne des tous les vaisseaux sanguins lymphatiques (Figure 12). Les cellules endothéliales ont été cultivées *in vitro* pour la première fois en 1970,[136] ce qui a permis des avancées majeures dans la compréhension de l'endothélium.[*] La taille moyenne des cellules endothéliales est de 0.5x10x100µm ; elles ont une forme allongée, leur grand axe étant parallèle à l'axe d'écoulement du sang. Les cellules endothéliales, **polarisées** grâce à leur cytosquelette d'actine, constituent une **interface dynamique** entre le sang circulant (pôle apical) et les tissus (pôle basal). Elles jouent un rôle central dans la régulation de fonctions physiologiques fondamentales comme **l'hémostase** (agrégation, coagulation et fibrinolyse), la **perméabilité** vasculaire, le **trafic nutritionnel et cellulaire**, **l'inflammation**, l'immunité innée et adaptative, le **tonus** vasomoteur ou encore **l'angiogenèse**.

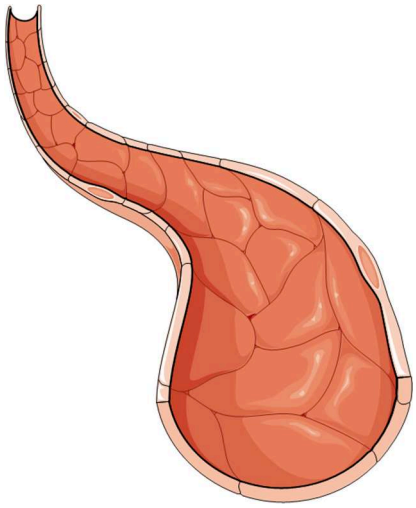


Figure 12: L'endothélium est une monocouche cellulaire à l'interface du sang et des tissus

Une caractéristique importante de l'endothélium est son **hétérogénéité phénotypique et sécrétoire**. Cette hétérogénéité dépend du **territoire** vasculaire,[137] cette spécificité tissulaire étant liée aux fonctions du tissu d'intérêt (Figure 13). Cette hétérogénéité spatiale dépend également du **lit vasculaire**[138]: il existe par exemple des différences du répertoire de sécrétion entre les veines et les artères, ou entre les cellules microvasculaires (vaisseau de calibre classiquement compris entre 4 et 300µm) et les cellules macrovasculaires (calibre de 300µm à 25mm), avec un certain degré de verrouillage épigénétique.[139] L'hétérogénéité phénotypique endothéliale est également temporelle : la cellule endothéliale fait preuve de

[*] Néanmoins, les cellules endothéliales *in vitro,* coupées de leur microenvironnement et des forces de cisaillement du flux sanguin, ont tendance à se *dédifférencier*. Elles ont en effet une forme cubique en condition de culture statique, et prennent en quelques heures une forme allongée lorsqu'elles sont soumises à un équivalent de flux sanguin dans une chambre de perfusion par exemple.

plasticité, et peut modifier son phénotype en fonction de son microenvironnement et des signaux reçus, tels que des médiateurs solubles, des cellules et des messages physico-chimiques comme le shear stress, le pH et la pO_2.

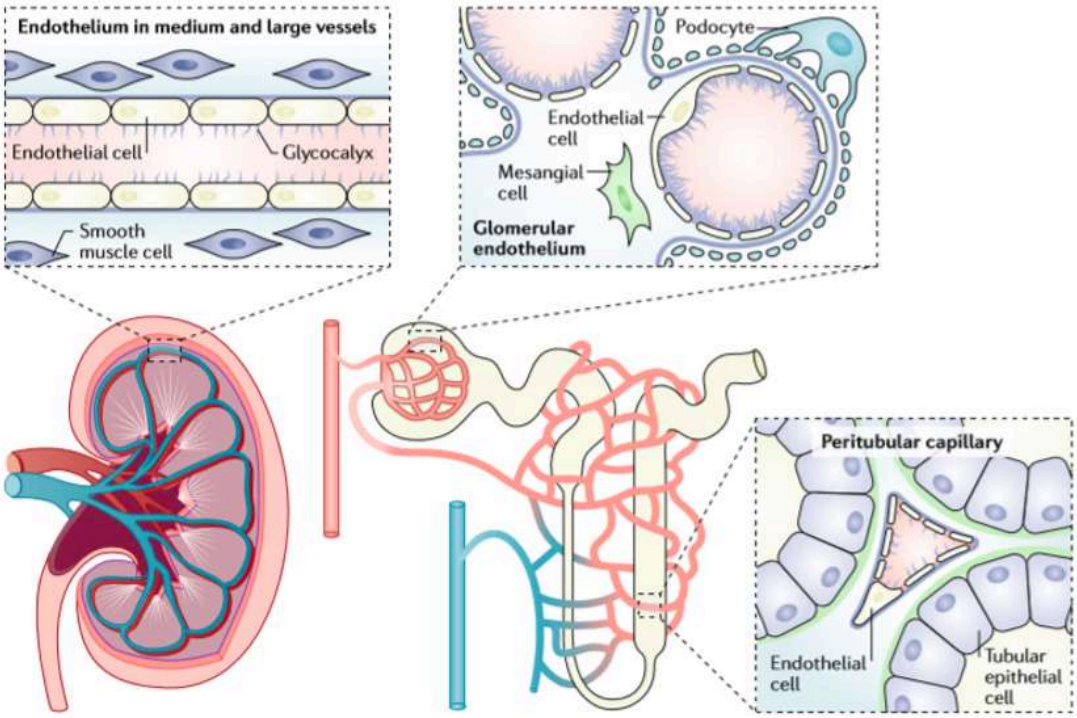


Figure 13: Au sein d'un même organe (ici le rein), il peut exister différents phénotypes de cellules endothéliales (adapté de Jourde-Chiche *et al*, Nature Review Nephrol, 2019[140])

2.2 Le concept de l'activation endothéliale

2.2.1 Considérations générales

2.2.1.1 Modifications phénotypiques

En condition quiescente, la cellule endothéliale a un phénotype antiagrégant, anticoagulant et anti-inflammatoire et protège le sang du caractère très procoagulant de la matrice sous-endothéliale.[139] Ces caractéristiques phénotypiques préviennent, en conditions physiologiques, la formation spontanée de thrombi et sont liées à l'expression de molécules antithrombotiques par l'endothélium, notamment le **TFPI** (Tissue-factor Pathway Inhibitor, la **TM** (Thrombomodulin), **l'EPCR** (Endothelial Protein C Receptor), le **t-PA** (Tissue-type Plasminogen Activator), le **NO** (monoxyde d'azote) et la **PGI2** (Prostacycline). De plus, parmi les glycosaminoglycanes qui composent le glycocalyx (revêtement fibrillaire à la surface de l'endothélium), on trouve **l'héparane sulfate**, cofacteur de l'antithrombine III participant au phénotype antithrombotique de l'endothélium sain.

En cas d'exposition à divers signaux tels que des cytokines, des toxines bactériennes, des signaux biomécaniques ou des contacts cellulaires, la cellule endothéliale va acquérir un phénotype de cellule « activée », qui est globalement :

- **Pro-agrégant**, notamment par la libération de vWF sur lequel peuvent se fixer les plaquettes
- **Procoagulant**, par diminution de l'expression des molécules impliquées dans la thromborésistance vues plus haut, et par expression du Facteur Tissulaire (FT), activateur principal de la voie extrinsèque de la coagulation, et du Plasminogen-Activator Inhibitor-1 (PAI-1)
- **Pro-inflammatoire**, par expression des molécules d'adhésion leucocytaires (telles que la P-sélectine et la E-sélectine) et par la majoration de la perméabilité intercellulaire qui permet une adhésion et un trafic leucocytaire facilité.

Notons que l'activation endothéliale est un **continuum dynamique** entre un phénotype quiescent et un phénotype activé. Par ailleurs, il existe une hétérogénéité spatiale : des caractéristiques phénotypiques permettant de caractériser un endothélium quiescent ou activé,[*] et certains médiateurs de l'inflammation, tels que le TNFα, auront des effets différents ou seulement partiellement communs en fonction des sites étudiés.

2.2.1.2 Vésiculation

Par ailleurs, l'activation endothéliale conduit à la vésiculation des cellules,[142] et notamment à la formation de **microvésicules endothéliales (MVE)**. Les microvésicules sont des vésicules extracellulaires de courte demi-vie, sont limitées par une bicouche phospholipidique, et ont une taille comprise entre 100 nm et 1000 nm (donc plus grandes que

[*] Par exemple, la P-sélectine est constitutivement exprimée par les cellules endothéliales quiescentes des veinules cutanées tandis qu'elle ne l'est pas par les cellules endothéliales mésentériques.[141]

les exosomes et plus petites que les corps apoptotiques). Elles sont générées par le bourgeonnement de la membrane plasmique, ce mécanisme nécessitant un flux calcique et l'intervention d'enzyme induisant l'externalisation de la phosphatidylsérine et la calpaïne qui clive le cytosquelette. Ainsi, les MVE sont porteuses des antigènes de la cellule d'origine. Les MVE contiennent des protéines, voire des organelles, ainsi que des acides nucléiques. Elles ont des rôles bien établis dans l'hémostase*, l'inflammation, l'angiogenèse, et sont en partie responsables de l'altération des capacités de régulation du tonus vasomoteur par l'endothélium activé (Figure 14). Les MVE ont probablement un rôle majeur dans la communication intercellulaire. Considérées initialement comme des **biomarqueurs** pour de nombreuses pathologies à tropisme vasculaire, elles sont **également des effecteurs biologiques** qui participent directement aux conséquences de l'activation endothéliale. Leur utilisation à visée thérapeutique est en cours de développement.[143]

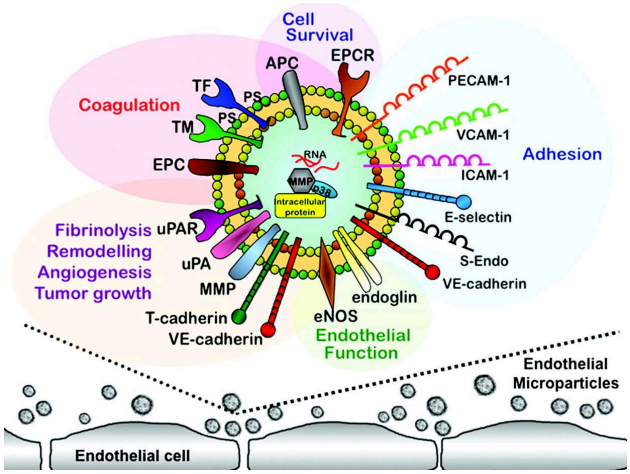


Figure 14: Propriétés des microvésicules endothéliales (d'après Dignat-George *et al*[143])

2.2.1.3 Deux types d'activation endothéliale

Depuis plusieurs années, il est usuel de distinguer **deux types d'activation endothéliale**,[144] cette distinction ayant été initialement décrite dans le contexte de l'inflammation.[145] L'activation endothéliale de type 1 est une activation rapide (quelques minutes) sans modification de l'expression des gènes et donc sans synthèse spécifique d'ARN messagers. Elle implique souvent des récepteurs couplés aux protéines G et un flux calcique intracellulaire. L'activation endothéliale de type 2 est un mécanisme plus lent et plus soutenu qui implique une synthèse spécifique d'ARN messagers et de protéines, et est classiquement déclenchée par le TNFα et les IL-1. Les voies de signalisation activées aboutissent à la translocation nucléaire des facteurs de transcription pro-inflammatoires NF-κB et AP-1, avec production de cytokines et de chimiokines. Néanmoins, ces deux types d'activation ne sont pas mutuellement exclusifs, et la spécificité des mécanismes effecteurs et des voies de signalisation entre ces deux types d'activation n'est que partielle.

* La présence de phosphatidylsérine et de facteur tissulaire en surface les rend globalement procoagulantes, bien qu'elles semblent également impliquées dans le processus de fibrinolyse.

2.2.2 Les Corps de Weibel-Palade

Les Corps de Weibel-Palade (CWP) sont des **organelles de stockage d'origine golgienne au sein des cellules endothéliales** et sont associés aux conséquences de l'activation endothéliale. Ces organelles sont denses en microscopie électronique (Figure 15) et ont une forme allongée caractéristique (forme de cigare). Leur biogenèse est complexe, semble très dépendante du processus de multimérisation du vWF, mais reste imparfaitement connue.[146]

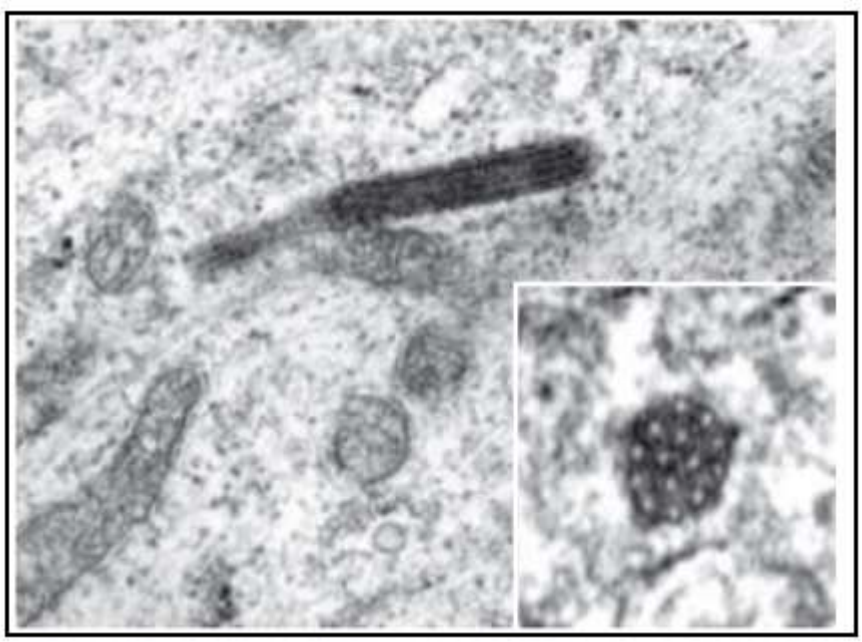


Figure 15: Les corps de Weibel Palade ont une forme de "cigare" (adapté de Goligorski *et al*[147])

Les CWP contiennent des effecteurs à l'origine de la majorité des fonctions régulatrices de l'endothélium,[148] avec les mêmes variantes concernant l'hétérogénéité spatiale et temporelle des cellules endothéliales : en effet certains de ces effecteurs ne sont présents que dans certains sites ou types de lit vasculaire, et certains ne sont présents que sous certaines conditions de stimulation.[146] Les CWP contiennent[146,148,149] :

- Principalement du vWF sous forme **d'UL-vWF**, décrit précédemment. Dans les cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques, les CWP contiennent également du facteur VIII.
- De la **P-sélectine** et des chimiokines comme l'interleukine 8 et de l'eotaxin-3
- De **l'endothéline 1**, qui a un rôle vasoconstricteur
- De **l'angiopoïétine 2**, molécule impliquée dans l'angiogenèse
- D'autres molécules telles que l'ostéoprotégérine, l'IGFBP7, le t-PA…

Au cours de l'activation endothéliale, les CWP peuvent rapidement libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire (principalement dans la circulation) par fusion avec la membrane plasmique apicale. Il existe 2 voies possibles conduisant à la dégranulation des CWP[149] (Figure 16):

1. **La voie calcium-dépendante** : la fixation d'agonistes tels que la thrombine et l'histamine sur des récepteurs couplés à des protéines G_q et G_i ($RCPG_{q/i}$), activent les phospholipases Cβ. Ceci conduit à la formation d'inositol triphosphate (IP3), qui se fixe sur l'IP3-récepteur du réticulum endoplasmique et induit une libération de calcium dans le cytoplasme. Ce flux calcique intracellulaire est un signal de danger qui conduit à la dégranulation du pool cortical des CWP et donc à la libération brutale de leur contenu (notamment des UL-vWF) dans la microcirculation. Le flux calcique va également être à l'origine de la majoration de la perméabilité intercellulaire[150] (par phosphorylation des chaînes légères de myosine et phosphorylation de la VE-Cadhérine) et il est impliqué dans le processus de vésiculation. D'autres agonistes sont connus pour induire une dégranulation endothéliale calcium-dépendante sans se fixer sur des RCPG, c'est notamment le cas du VEGF (qui se fixe sur un récepteur à tyrosine kinase[*]) et du TNFα (qui se fixe sur un TNF-R).
2. **La voie AMPc dépendante** : des agonistes tels que la sérotonine et l'adrénaline se fixent sur des récepteurs couplés à des protéines G_s, activant l'adénylate cyclase et augmentant ainsi le taux cytoplasmique d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). Ceci conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui va induire la dégranulation – plus modeste – du pool microtubulaire de CWP. Cette activation endothéliale AMPc dépendante est associée à une diminution de la perméabilité vasculaire.

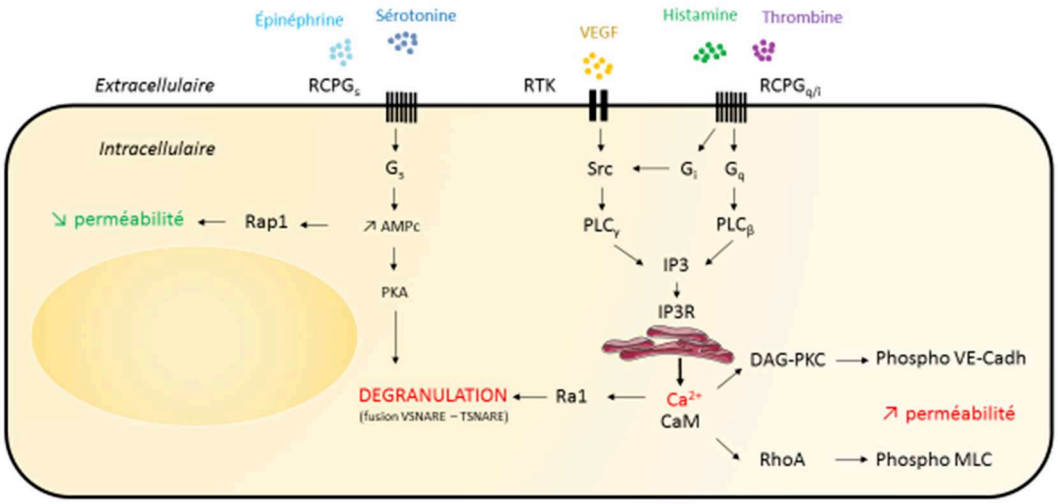


Figure 16: Principaux acteurs moléculaires impliqués au cours de l'activation d'une cellule endothéliale conduisant à la dégranulation des CWP et à la majoration de la perméabilité endothéliale

[*] Une étude suggère néanmoins que le VEGF peut induire une libération de vWF indépendamment du flux calcique intracellulaire de la voie AMPc ; cette troisième voie impliquerait directement une activation de la PKCδ.[151]

Par ailleurs, le **NO** est décrit comme un inhibiteur de l'exocytose des corps de Weibel Palade. La voie de transduction PI3K/Akt favorise l'activation d'eNOS (*endothelial NO synthase*), et donc la production de NO. Des situations de stress endothélial chronique (inflammation chronique) peuvent induire un découplage de la NO synthase. La liaison du NO avec des espèces réactives de l'oxygène (O_2^-) peut produire du peroxynitrite ($ONOO^\cdot$), qui va à l'inverse favoriser la dégranulation des corps de Weibel-Palade.

2.2.3 De l'activation endothéliale à la dysfonction endothéliale

L'activation endothéliale est un **phénomène physiologique** bien régulé de réponse à un danger, mais ce processus peut devenir **délétère lorsqu'il devient chronique ou incontrôlé**. En effet, une activation chronique et/ou incontrôlée va induire une dysfonction de la cellule endothéliale, c'est-à-dire la perte, à des degrés variables, des capacités de l'endothélium à assurer la régulation des fonctions physiologiques auxquelles il participe : hémostase, coagulation, inflammation, tonus vasomoteur….

La dysfonction endothéliale est *stricto sensu* un terme utilisé pour caractériser la perte de **capacité de régulation du tonus vasomoteur NO-dépendante** en réponse à des stimuli biomécaniques ou chimiques.[152,153] La dysfonction endothéliale chronique implique une diminution de la biodisponibilité du NO.[*] L'existence de perturbations du flux sanguin participe activement à la dysfonction endothéliale et induit des modifications épigénétiques au sein des cellules endothéliales.[154,155] La dysfonction endothéliale est associée à une majoration de la sénescence et de l'apoptose des cellules endothéliales et constitue un **marqueur mais également probablement un acteur du risque cardiovasculaire**. En effet ce lien entre l'inflammation chronique et la dégranulation endothéliale est une explication mécanistique à l'origine des phénomènes athérothrombotiques survenant chez les patients avec des facteurs de risque cardiovasculaire et donc de dysfonction endothéliale.[147]

[*] Plus récemment, le terme de dysfonction endothéliale a été utilisé pour caractériser de manière générale le phénotype endothélial activé de manière chronique.

2.2.4 Comment explorer l'endothélium en pratique clinique ?

Contrairement aux études *in vitro* (qui seront détaillées plus loin) dans lesquelles il est possible d'apprécier le degré d'activation des cellules endothéliales par des études morphologiques, une analyse des marqueurs phénotypiques ou des tests fonctionnels, il est difficile d'apprécier simplement en pratique clinique la fonctionnalité et le degré d'activation de l'endothélium. Plusieurs méthodes d'investigation de l'endothélium sont néanmoins utilisées chez l'homme : l'étude histologique, le dosage de biomarqueurs (solubles ou cellulaires) et la réalisation de tests fonctionnels.

1. La biopsie avec analyse morphologique et immuno-histologique de l'endothélium est rarement utilisée, compte tenu de son caractère invasif et de l'étude très focale de l'endothélium. Néanmoins, des signes histologiques d'agression de l'endothélium (turgescence et nécrose des cellules endothéliales) sont fréquemment observés dans les MAT, notamment sur biopsies rénales dans les MAT à tropisme néphrologique.

2. Le dosage de biomarqueurs est utilisé chez l'homme pour apprécier de manière systémique le degré d'activation et/ou de dysfonction de l'endothélium.[140,156,157] On distingue les biomarqueurs plasmatiques des biomarqueurs cellulaires.
    - Les **biomarqueurs plasmatiques** peuvent être des paramètres hémostatiques tels que la thrombomoduline soluble, le facteur tissulaire soluble, et le vWF (ou le ratio pro-vWF/vWF), le t-PA, le PAI-1 ; il est également possible de doser des cytokines et des marqueurs d'adhésion tels que VCAM soluble, ICAM soluble ou la E-sélectine. La P-sélectine est utilisée dans plusieurs études : reflet de la dégranulation des CWP de l'endothélium, ce biomarqueur est également relargué par les plaquettes, manquant ainsi de spécificité. La pertinence clinique de la plupart de ces biomarqueurs n'est actuellement pas avérée.[156]
    - Les **biomarqueurs cellulaires** sont de développement plus récent. Ils mesurent des paramètres du compartiment endothélial circulant : les **MVE** évoquées précédemment et libérées lors de l'activation et de la dysfonction endothéliale et les **cellules endothéliales circulantes** (CEC) libérées dans le sang périphérique à la suite de lésions de l'endothélium. Le taux d'MVE et de CEC est associé à une augmentation du risque cardiovasculaire et à un mauvais pronostic[142,157] dans de nombreuses pathologies à tropisme vasculaire. Il n'est pas exclu que les MVE, voire les CEC, participent activement à la sévérité des pathologies et du risque vasculaire, en vectorisant des signaux délétères. Il est également possible d'apprécier les mécanismes de régénération de l'endothélium par le dosage des **progéniteurs endothéliaux circulants** (PEC), qui peuvent être d'origine hématopoïétique ou endothéliale. La balance entre les MVE et CEC d'une part (marqueurs d'activation et de lésion endothéliale) et les PEC d'autre part (marqueurs de régénération) permet théoriquement de définir un profil individuel de « vasculocompétence »,[142] mais les problématiques de standardisation des dosages et des conditions pré-analytiques rendent l'interprétation de ces données difficile à l'heure actuelle.

3. Il existe des tests fonctionnels, basés sur la capacité de l'endothélium à adapter le tonus vasomoteur en réponse à des signaux chimiques et biomécaniques, notamment au débit sanguin. Lors d'une majoration locale du débit sanguin, l'augmentation des forces de cisaillement conduit à une production de NO par la cellule endothéliale, faisant intervenir eNOS. Le NO va agir sur les cellules musculaires lisses sous-endothéliales et induire une relaxation du vaisseau. La diminution de la résistance vasculaire en résultant permet ainsi de maintenir la pression artérielle stable. La perte de la capacité de l'endothélium à moduler le tonus vasomoteur est un marqueur précoce de dysfonction endothéliale, qui peut être mesuré par différentes méthodes non invasives. La méthode la plus utilisée s'appelle « flow-mediated dilatation », son principe est de mesurer par échographie l'augmentation du diamètre de l'artère brachiale induite par l'hyperhémie post-ischémique.[158]

4. Des techniques de protéomique[159,160] et d'imagerie moléculaire[161] ciblant les cellules endothéliales sont également possibles.

2.3 La perméabilité endothéliale

La perméabilité est l'une des fonctions clés de l'endothélium. Elle est intimement corrélée à l'ultrastructure endothéliale locale et donc aux rôles spécifiques de l'endothélium dans un organe donné. Même s'il existe une perméabilité endothéliale transcellulaire (notamment médiée par les cavéoles), la régulation de la perméabilité endothéliale repose essentiellement sur les **jonctions des inter-endothéliales**.

La régulation de la perméabilité participe à l'homéostasie de chaque organe. L'inflammation, qu'elle soit aiguë ou chronique, induit comme nous l'avons vu une majoration de la perméabilité. Cette majoration de la perméabilité semble participer à la physiopathologie à des degrés dans différentes situations.[*] On notera notamment :

- Le sepsis (œdème, hypotension artérielle…)
- Le COVID-19 : les formes sévères de COVID-19 sont associées à une augmentation de la perméabilité endothéliale pulmonaire.[162]
- De manière plus chronique, une augmentation de la perméabilité endothéliale participe à la physiopathologie de maladie tels que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, la rétinopathie diabétique ou encore l'asthme.[163,164]
- Une dysfonction de la barrière hémato-encéphalique (mesurée sur certaines séquences d'IRM cérébrale), est associée à des états confusionnels dans les suites de chirurgie cardiaque lourde.[165]

De nombreux médiateurs sont susceptibles de majorer la perméabilité endothéliale, notamment l'histamine, la thrombine, le PAF (platelet activating factor), de nombreuses cytokines, le VEGF.[166] A l'inverse, certains médiateurs tels que l'angiopoïétine 1 et la Sphingosine 1-Phosphate diminuent la perméabilité endothéliale et améliorent ainsi la fonction de barrière.[167,168] De plus, nous avons vu précédemment que l'activation de la voie AMPc dépendante (en aval de l'activation des RCPGs)[169] diminue également la perméabilité endothéliale.[†]

[*] La majoration de la perméabilité endothéliale est à l'origine des signes inflammatoires locaux (« rubor, calor, dolor, tumor ») qui ont été décrits il y a plus de deux millénaires par Aulus Cornelius Celsus dans son texte « De Medicina ».

[†] On comprend alors ainsi la raison pour laquelle certains agonistes des RCPGs (tels l'adrénomédulline, la prostacycline (PGI2), la prostaglandine E2 (PGE2) et des agonistes β-adrénergiques) limitent l'hyperperméabilité induite par ces médiateurs inflammatoires.

2.3.1 Quels sont éléments à l'origine de la fonction de perméabilité ?

La fonction de barrière endothéliale est notamment permise par des structures extracellulaires telles que le glycocalyx, la matrice extracellulaire et les jonctions intercellulaires.

2.3.1.1 Le glycocalyx

Le glycocalyx est un **revêtement fibrillaire** présent à la surface de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales. Il a été identifié dans les années 1960 grâce à l'avènement de la microscopie électronique. Dans les vaisseaux, il revêt toute la partie luminale du vaisseau. Il est composé de protéoglycane et de glycoprotéines (« *sugar coat* ») et son épaisseur va de 20 à 400 nm. Le glycocalyx permet, notamment grâce à ses charges négatives, de limiter l'interaction spontanée des éléments figurés du sang (notamment les plaquettes) et des macromolécules avec la surface des cellules endothéliales. De plus le glycocalyx est l'un des éléments impliqués dans la « perception » cellulaire du shear stress et est donc indirectement associé à la production de NO par eNOS.[170]

2.3.1.2 Les jonctions inter-endothéliales

Des cellules endothéliales voisines sont liées par des jonctions intercellulaires. On distingue classiquement :

- **Les jonctions communicantes** (GAP junctions), dans lesquelles il existe des ponts cytoplasmiques entre 2 cellules endothéliales adjacentes.
- **Les jonctions serrées** (tight junctions), très étanches, au sein desquelles on retrouve des molécules importantes telles que les occludines,[*] claudines et JAMs (*junctional adhesion molecules*).
- **Les jonctions adhérentes** (adherens junctions, également appelées jonction d'ancrage), qui sont particulièrement importantes dans la régulation de la perméabilité endothéliale. On trouve au sein de ces jonctions la nectine et surtout la VE-Cadhérine.

[*] Le niveau d'expression de l'occludine est associé au « niveau d'étanchéité » de la barrière endothéliale et est donc plus élevé au niveau du compartiment artériel que veineux.[171] Des organes à la perméabilité vasculaire très réduite (cerveau avec la BHE) ont un endothélium riche en jonctions serrées.[172]

2.3.2 Détail de la VE-Cadhérine

La VE-Cadhérine, également connue sous les noms de Cadhérine 5 et **CD144**, appartient à la superfamille des Cadhérines.[*] C'est la protéine transmembranaire qui se trouve au cœur de la régulation de la perméabilité endothéliale. Il a été montré il y a plus d'une vingtaine d'année que l'administration d'anticorps anti-VE-Cadhérine à la souris induisait un tableau d'hyperperméabilité et de fragilité vasculaire majeure.[175] Cette protéine est également impliquée en biologie du développement : c'est la première protéine spécifique de l'endothélium détectable dans les néovaisseaux embryonnaires.[176]

La VE-Cadhérine est une protéine transmembranaire (Figure 17) qui est composée de 3 parties :

- **extracellulaire** (5 domaines de cadhérine) qui permet les **interactions homophiliques**
- un domaine transmembranaire
- **intracellulaire** (« la queue cytoplasmique ») qui est « connectée » au *signaling* intracellulaire notamment calcium-dépendant. La queue cytoplasmique est liée à la p120-caténine et à la β-caténine + plakoglobine, elles-mêmes liées à la α-caténine qui est liée, directement ou indirectement, au cytosquelette d'actine.[†]

De nombreuses molécules, notamment l'histamine, la thrombine et le VEGF, peuvent modifier la perméabilité vasculaire en agissant sur la VE-Cadhérine. La voie classique implique **Src kinase**, qui peut induire la **phosphorylation de la VE-Cadhérine**, ce qui conduit à son **internalisation**. Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés, mais le site principal de phosphorylation semble être les résidus tyrosine Y685 pour la perméabilité endothéliale. La déphosphorylation du résidu tyrosine Y731 est probablement davantage impliquée dans la transmigration leucocytaire[‡] (ou diapédèse).[181] Notons que la procalcitonine[§] induit la phosphorylation de la tyrosine Y685 de la VE-Cadhérine via le *signaling* Src kinase.

[*] Les cellules endothéliales expriment également la N-Cadhérine, qui n'est pas spécifique des cellules endothéliales et que l'on ne retrouve pas au niveau des jonctions d'ancrage inter-endothéliale. La N-Cadhérine est impliquée dans les contacts avec d'autres types cellulaires (péricytes, astrocytes…)[173]. La perte de la N-Cadhérine n'est pas viable, notamment à cause de défaut dans la vasculogenèse. Il semblerait que la N-Cadhérine soit une protéine favorisant la *mobilité* cellulaire, à l'opposé de la VE-Cadhérine.[174] Dans certains vaisseaux, notamment cardiaques, 2 autres cadhérines sont exprimées : la P-Cadhérine et la T-Cadhérine.

[†] Certaines observations tendent à montrer que l'α-caténine n'est pas reliée directement reliée au cytosquelette d'actine, mais qu'il existe des protéines « pont » tels que la vinculine, l'α-actinine et la protéine EPLIN.[177,178]

[‡] Cette dernière ne requiert pas nécessairement une majoration de la perméabilité, contrairement à ce qui a longtemps été supposé. La possibilité de moduler pharmacologiquement la perméabilité endothéliale sans compromettre la réponse immunitaire (qui comprend le recrutement leucocytaire) laisse d'entrevoir des possibilités thérapeutiques intéressantes, notamment dans les états septiques en réanimation.[179] En plus du passage paracellulaire, il a été montré que les leucocytes peuvent traverser la barrière endothéliale de manière transcellulaire. Les mécanismes de la transmigration leucocytaire ont fait l'objet d'une revue détaillée récente.[180]

[§] La procalcitonine (PCT) est sécrétée en conditions basales par les cellules C thyroïdienne et par des cellules neuroendocrines pulmonaires, mais les monocytes activés qui adhèrent à l'endothélium peuvent également en sécréter, et surtout la production de PCT par les adipocytes.[182] On connaît surtout la procalcitonine dans l'aide qu'elle peut constituer au clinicien pour distinguer une infection virale d'une infection bactérienne (notamment pour les pneumopathies en réanimation)

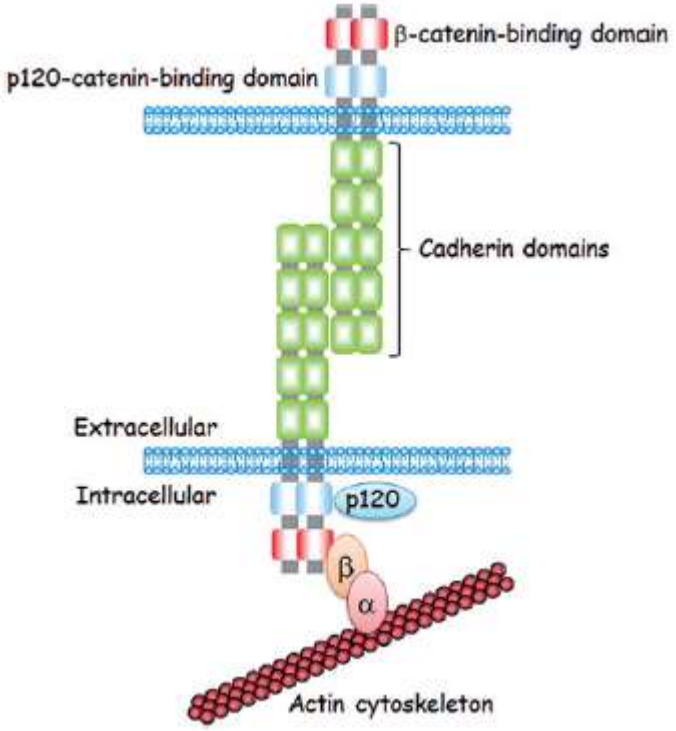


Figure 17: Représentation schématique de la VE-Cadhérine (adapté de Seung-Sik Rho *et al*[183]). p120 : p120-caténine, α : α-caténine, β : β-caténine.

Le niveau de phosphorylation des VE-Cadhérines est régulé par différentes phosphatases associées aux jonctions adhérentes (tels que VE-PTP, SHP2 et DEP1). Le VE-PTP tend à maintenir la VE-Cadhérine dans un état déphosphorylé et donc promeut le maintien de l'intégrité vasculaire.[184]

Une composante importante de la modulation de perméabilité est **l'organisation spatiale des jonctions d'ancrage** : les jonctions peuvent être réparties de manière linéaire ou focale. Cette organisation est notamment dépendante de **l'orientation spatiale de la polymérisation des filaments d'actine.** La signalisation RhoA-ROCK-Formin induit la polymérisation *radiale* de l'actine et la phosphorylation des **chaînes légères de myosine** (NM-II, ou MLC pour myosin light chain)[185,186] ; ceci induit des jonctions d'ancrage réparties de manière focale, conduisant à une majoration la perméabilité en induisant une *contraction* des cellules liée à la formation des fibres de stress.*

En revanche, la signalisation Rap1† a tendance à activer les NM-II jonctionnelles via la **voie Cdc42-MRCK**, et à induire une phosphorylation circonférentielle de l'actine formant des CABs (*Circonferential Actin Bundles*), et les VE-Cadhérines sont stabilisés (Figure 18). Rap1, inhibiteur de la signalisation Rho, via l'accumulation de Cdc42, va **polariser la polymérisation actinique** (*soit radiale soit circonférentielle*) et ainsi aboutir à une conséquence phénotypique cohérente (majoration de la perméabilité vs stabilisation jonctionnelle). Enfin, la capacité

* Les acteurs inflammatoires ont tendance à agir sur la signalisation Rho et ainsi induire une augmentation de la perméabilité.

† Rap1 : GTPase appartenant à la superfamille Ras, également connue pour induire l'adhésion à la matrice extracellulaire.

qu'ont les cellules endothéliales à contrôler la perméabilité est très variable en fonction du site anatomique : cette capacité semble faible dans les veinules post-capillaires, et est à l'inverse très élevée au niveau cérébral. Ces molécules de *signaling* intracellulaire sont bien sûr des cibles thérapeutiques intéressantes pour les pathologies avec de l'hyperperméabilité.[*]

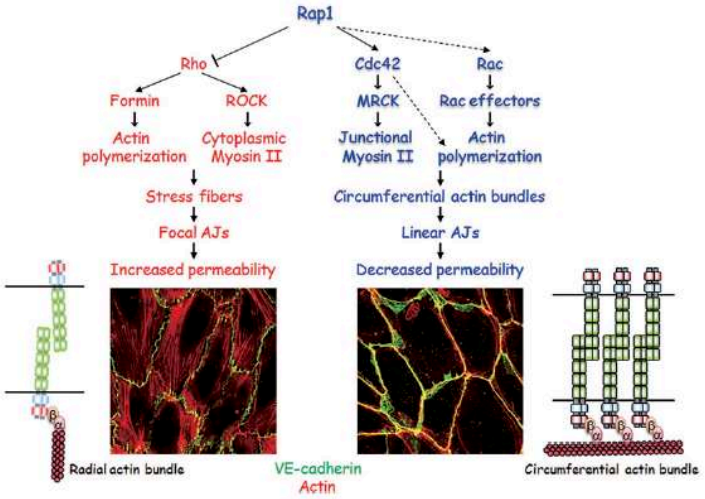


Figure 18: La réorganisation du cytosquelette modifie l'organisation des jonctions adhérentes et influe sur la perméabilité (adapté de Seung-Sik Rho *et al*[183]).

2.3.3 L'axe angiopoïétine-Tie 2

Tie 2 est une tyrosine kinase transmembranaire, récepteur des ligands Angiopoïétine 1 et 2. L'angiopoïétine 1, essentiellement sécrétée par les cellules mésenchymateuses, est l'agoniste de Tie 2 et agit souvent de manière paracrine. L'activation de Tie2 promeut un phénotype vasculaire quiescent avec notamment l'inhibition de la phosphorylation de Src kinase, l'activation de l'axe PI3K/Akt qui inhibe RhoA, l'inhibition de l'activation de NF-κB et donc l'inhibition de l'expression des molécules ICAM et VCAM.[188]

L'angiopoïétine 2 (qui est stockée dans les CWP) agit de manière essentiellement autocrine en bloquant Tie2 [†] .[190] L'axe Ang1-Ang2-Tie2 est l'objet de développements thérapeutiques.[‡]

---

[*] Par exemple, il a été rapporté que l'inhibition de la voie Rho-ROCK par le Fasudil inhibe la fuite vasculaire dans un modèle murin d'anaphylaxie.[187]

[†] Le taux sérique de d'Ang2 peut être multiplié par 200 au cours d'état septiques sévères. Des taux élevés d'Ang2 sont associés à des *outcomes* défavorables en réanimation (au cours du sepsis, mais également au cours d'infections virales graves et des chirurgies lourdes) mais il évidemment impossible de conclure à une causalité, la dégranulation endothéliale massive pouvant être la cause ou le reflet d'un état sévère. Néanmoins, des données animales sont en faveur d'un rôle causal direct de l'Ang2.[189]

[‡] Le Rosiglitazone, un PPARγ agoniste initialement utilisé comme insulino-sensibilisateur chez les diabétiques, a montré un effet de diminution du ratio Ang2/Ang1, et a dans ce sens été essayé au cours du paludisme chez l'homme,[191] et dans un modèle murin de paludisme cérébral.[192] On notera que le rosiglitazone a été retiré du marché européen en 2010 à cause d'effets indésirables cardiovasculaires. Par ailleurs, il semble possible d'activer Tie2 en inhibant la protéine VE-PTP, en utilisant par exemple le utilisant le razuprotafib AKB-9778, qui est utilisé dans des études préliminaires de l'œdème maculaire au cours de la rétinopathie diabétique.[193] Enfin, l'ABTAA, un anticorps liant Ang2 et activant Tie2 a montré un effet intéressant d'inhibition de la perméabilité endothéliale VE-Cadhérine dépendante et une amélioration de la survie dans un modèle murin de sepsis.[194]

3. L'activation endothéliale au cours du PTT

L'accumulation des UL-vWF dans la microcirculation est essentielle dans la physiopathologie du PTT. Les UL-vWF étant essentiellement stockés dans les cellules endothéliales, il est donc proposé que l'activation endothéliale constitue l'élément déclencheur du PTT sur un terrain de déficit en ADAMTS13. La partie suivante présente les arguments cliniques et expérimentaux soutenant ou contredisant cette hypothèse.

3.1 Quels éléments témoignent de l'activation endothéliale au cours du PTT

3.1.1 Arguments cliniques

Les patients atteints de PTTc ont une activité ADAMTS13 nulle (ou très faible) tout au long de leur vie en l'absence de traitement. Néanmoins, il n'est pas rare que le premier épisode de PTT ne survienne que plusieurs dizaines d'années après la naissance, notamment pendant la grossesse chez les femmes.[17,60,85] De plus, les patients atteints de PTTi gardent pendant des mois une activité ADAMTS13 < 5% sans pour autant présenter un tableau de microangiopathie thrombotique.[195,196] Ainsi, **le déficit en ADAMTS13 semble être une condition nécessaire mais non suffisante** pour déclencher la microangiopathie. On notera qu'un épisode pseudo-grippal est fréquemment décrit dans les prodromes, appuyant l'hypothèse d'un facteur déclenchant, dont la nature est discutée plus loin.

3.1.2 Exploration de l'endothélium au cours du PTT chez l'humain

3.1.2.1 Dosage des biomarqueurs solubles

Les patients atteints de PTT en phase aiguë ont des **taux élevés de marqueurs d'agression endothéliale** :Takahashi *et al*[197] rapportent dès 1991 que le taux de thrombomoduline circulante est plus élevé chez les patients atteints de PTT en phase aiguë que chez les volontaires sains, et diminue significativement lors des rémissions.[198,199] Mori *et al*[200] rapportent qu'un taux élevé de thrombomoduline soluble est associé à la mortalité chez les patients, et ont proposé de l'utiliser comme marqueur d'agression endothéliale. La P-sélectine soluble,[201,202] le t-PA soluble,[203] le PAI-1 soluble[200] et le vWF-Ag (vWF antigène soluble) ont également été suggérés comme marqueurs d'activation endothéliale, la P-sélectine soluble semblant corrélée aux marqueurs classiques d'activité du PTT (plaquettes et LDH).[204] Récemment, des auteurs ont identifié que des taux élevés de Syndecan-1 (composant

du glycocalyx) et de thrombomoduline soluble à l'admission des patients étaient associés à la mortalité.[205]

Certains auteurs ont suggéré que cet état d'activation endothéliale était associé à un état d'hypercoagulabilité[206] sans hyperfibrinolyse[207] en se basant sur des paramètres hémostatiques, tel que le rapport TFPI/facteur tissulaire, le dosage du t-PA et du PAI-1.[203,207] Ces paramètres sont aujourd'hui peu utilisés dans ce contexte, et leur relevance paraît d'ailleurs discutable, notamment car les microthrombi au cours du PTT sont pauvres en fibrine[56] ce qui laisse penser que l'activation de la coagulation n'est probablement pas majeure dans cette pathologie. Des données plus récentes suggèrent un rôle du système fibrinolytique induit par l'hypoxie endothéliale comme voie secondaire de clivage des multimères du vWF au cours du PTT,[208] et une altération du potentiel fibrinolytique de l'endothélium a été évoquée comme participant au déclenchement de la pathologie.[209]

Bien que le vWF ait été utilisé isolément comme marqueur d'activation endothéliale,[198] Van Mourik *et al*[210] ont proposé de mesurer le ratio [vWF-Ag/propeptide] pour différencier une activation endothéliale aiguë d'une activation chronique. En effet, les sécrétions du vWF et de son propeptide clivé pendant la maturation sont équimolaires, mais leurs demi-vies sont différentes, la demi-vie du propeptide étant 5 fois plus courte que celle du vWF mature. Ils montrent ainsi que le ratio [vWF Ag/propeptide] permet de distinguer l'activation endothéliale chronique au cours du diabète des activations aiguës du sepsis et du PTT. L'étude de ce ratio ne permet néanmoins pas de différencier les exacerbations des rémissions (étude prospective menée chez 9 patients en 2003).[211] Ce ratio a probablement un intérêt limité en pratique clinique, la déplétion brutale initiale des Corps de Weibel-Palade (dont le contenu se reconstitue progressivement) et la possible épuration de l'activateur endothélial lors des échanges plasmatiques rendent difficile l'interprétation des données. De plus, la pertinence même du dosage du vWF Ag au cours du PTT est discutable, notamment compte tenu de l'existence du déficit en ADAMTS13 et du fait qu'un taux élevé d'UL-vWF circulant ne soit pas corrélé à l'activité du PTT.[212]

Plus récemment, Lu et Zheng ont décrit que les taux de *« Big Endothelin 1 »* (précurseur de l'endothéline-1 et contenus dans les CWP) étaient augmentés à l'admission chez les patients en phase aiguë de PTT, et que des taux élevés étaient associés à la mortalité hospitalière.[213] La persistance de taux plasmatiques élevés de Big endothelin-1 pendant la réponse clinique est associée à des exacerbations.

3.1.2.2 Dosage du compartiment endothélial circulant

Jimenez *et al* ont été les premiers à s'intéresser aux **MVE** dans le PTT. Après avoir montré que l'incubation de plasmas de patients PTT avec des lignées microvasculaires (rénale et cérébrale) induisait une importante production de microvésicules procoagulantes,[214] ils ont montré que les taux de microvésicules endothéliales circulantes étaient élevés chez les patients durant la phase aiguë du PTT,[215] et que ces taux se normalisaient lors de la rémission, juste avant la normalisation des plaquettes et des LDH. Ces microvésicules exprimaient des marqueurs phénotypiques d'activation endothéliale en cytométrie en flux (ratio [CD62E+]/[CD31+/CD42b-]).

La présence de **cellules endothéliales circulantes (CEC)**, marqueurs d'agression endothéliale,[142] a été attestée au cours du PTT dès 1993,[216] et a été confirmée par Widemann

et al au cours d'une étude prospective multicentrique qui a étudié le profil de « vasculocompétence » chez 22 patients (Figure 19).[204] Les auteurs ont retrouvé que les patients atteints de PTT avaient des taux élevés de CEC en phase aiguë et que ces taux se normalisaient en rémission. Un taux élevé de CEC était associé à une plus grande sévérité clinique. Ils ont également montré qu'en phase aiguë les patients avaient des taux élevés de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC), témoignant de capacités de réparation accélérées de l'endothélium, avec normalisation en rémission, et que les patients avec les taux les plus élevés de PEC nécessitaient moins d'échanges plasmatiques pour obtenir la rémission. Les CEC ont été également retrouvés augmentées dans d'autres MAT.[217]

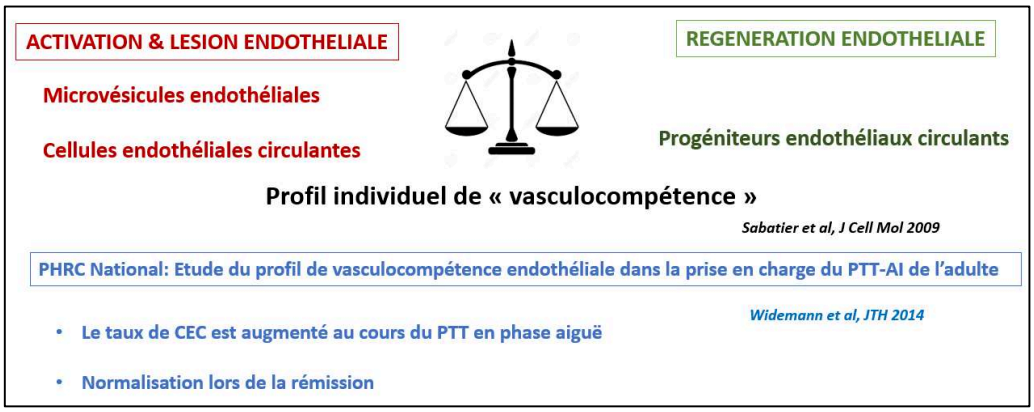


Figure 19: Le PHRC ENDO13 a étudié le profil de "vasculocompétence" des patients atteints de PTTi

3.1.2.3 Données histologiques chez l'humain

Toutes ces données sont des éléments en faveur de l'existence d'une agression de l'endothélium, mais ne permettent pas de dire clairement si cette activation endothéliale est initiatrice de la microangiopathie, ou si elle est secondaire à la formation des microthrombi.

Dang *et al*[218] apportent sur cette question un élément de réponse intéressant. Ils ont analysé les rates de 8 patients atteints de PTT et les ont comparées à 6 rates contrôles (issues de splénectomies réalisées pour des PTI), en recherchant la présence de thrombi et en étudiant l'apoptose des cellules endothéliales par technique TUNEL et par l'expression de Fas (CD95) en immunohistochimie. Ils mettent en évidence des phénomènes apoptotiques de l'endothélium avec une surexpression de Fas dans les rates issues de patients PTT par rapport aux contrôles. De nombreuses cellules apoptotiques sont observées mais ne co-localisent pas avec des thrombi, suggérant que l'apoptose des cellules endothéliales est un phénomène qui précède au moins en partie l'ischémie, et est possiblement même initiatrice de la formation des thrombi. Néanmoins, comme relevé par Jimenez,[219] les pourcentages de cellules apoptotiques sont difficiles à interpréter sans une mesure de l'activation endothéliale, Fas étant par ailleurs également un marqueur d'activation endothéliale NF-κB-dépendant.

3.1.3 Données issues de l'expérimentation *in vitro*

Burns *et al*[220] rapportent dès 1982 que les sérums de 3 patients atteints de PTT ont un effet pathogénique sur les cellules de veine de cordon ombilical humaines (HUVEC), alors que les sérums issus de volontaires sains n'en ont pas. Ils mettent en évidence que c'est la fraction IgG des patients qui est impliquée dans la cytotoxicité endothéliale, et montrent que les IgG des patients PTT se fixent sur les cellules endothéliales *in vitro*, induisant des lésions ultrastructurales en microscopie électronique.

De nombreuses études *in vitro* montrent par la suite les effets des plasmas PTT sur les cellules endothéliales en culture. Laurence *et al*[221] rapportent que les plasmas issus de 4 patients atteints de PTT aigu (dont 1 patient PTT associé au VIH) induisent l'apoptose de cellules endothéliales microvasculaires *in vitro* mais pas des cellules macrovasculaires, apoptose non retrouvée lors de l'utilisation de plasmas de patients ayant une CIVD ou une infection à VIH asymptomatique. De plus, ils montrent que cette apoptose est médiée par l'expression de Fas (CD95) sur ces cellules microvasculaires, mais qu'elle semble indépendante du TNFα ou de CD36. CD36 avait été suspecté en raison de son implication possible dans l'apoptose, de son expression assez spécifique de l'endothélium microvasculaire *in vivo*, et également car des Ac anti-CD36 ont été fréquemment rapportés chez les patients atteints de PTT.[222,223] Mitra *et al*[224] ont par la suite précisé ces travaux en montrant que les plasmas de patients PTT en phase aiguë (mais pas les plasmas contrôles) induisent *in vitro* l'apoptose (Fas-médiée, avec implication des caspases 1 et 3)[225] des cellules microvasculaires d'origine dermique, cérébrale et rénale (qui adoptent un profil prothrombotique, avec une baisse de la sécrétion de PGI2) mais pas des cellules microvasculaires hépatiques et pulmonaires ni des cellules macrovasculaires, les gros vaisseaux, le foie et le poumon étant classiquement épargnés au cours du PTT.

Jimenez *et al* ont retrouvé un effet essentiellement activateur des plasmas PTT sur les cellules microvasculaires mais sans franche induction d'apoptose,[214,215] cette interprétation étant notamment basée sur les caractéristiques phénotypiques des microvésicules émises,[226] qui sont théoriquement semblables à celles de la cellule d'origine. Ils ont également montré que ces microvésicules émises *in vitro* transportent du vWF[215] et qu'elles ont un fort pouvoir pro-agrégant plaquettaire.[227] Il n'est pas exclu que les résultats discordants *in vitro* entre les différentes équipes concernant l'apoptose des cellules endothéliales au cours du PTT soient au moins en partie d'origine expérimentale.[219,228]

Enfin, notre équipe a pu récemment montrer que les plasmas de patients PTTi en phase aiguë induisent une dégranulation calcium-dépendant des CWP des cellules microvasculaires d'origine dermique (HMVEC-d) avec libération de vWF, d'endothéline-1, d'angiopoïétine 2 et de P-sélectine, par rapport aux plasmas de patients contrôles ou des mêmes patients en rémission. La sévérité clinique des patients est corrélée à l'intensité du flux calcique induit. Ces résultats ont été publiés récemment[229] (Figure 20 et Annexe 2).

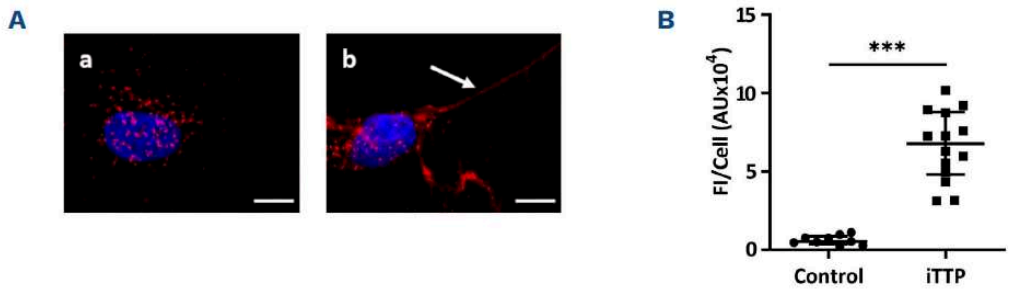


Figure 20: Les plasmas PTTi induisent une libération de vWF plus importante que les plasmas contrôles (adapté de Tellier *et al*, Haematologica 2022)

3.1.4 Données issues de l'expérimentation animale

3.1.4.1 Modèles murins

Motto *et al* ont été les premiers à générer des souris déficientes homozygotes pour le gène codant pour ADAMTS13 sur un fond génétique mixte C57BL6/J et 129X1/SvJ,[230] et ils ont montré qu'en dépit d'une activité ADAMTS13 indosable, les souris ne présentaient pas de signe biologique ou histologique de PTT. Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Banno *et al,*[231] qui ont généré des souris ADAMTS13-/- sur un fond génétique pur 129/Sv. S'il n'existe pas de signe de MAT chez ces souris ADAMTS13-/-, elles présentent néanmoins un phénotype pro-thrombotique et pro-inflammatoire (Figure 21). L'équipe de Motto *et al* a ensuite montré que le croisement des souris KO ADAMTS13 sur le fond génétique CASA/Rk (souche de souris ayant des taux plus élevés de vWF) induisait chez les animaux un état pro-thrombotique, avec des plaquettes légèrement plus basses et une survie discrètement diminuée. **Ils ont alors montré qu'il était possible de déclencher le PTT (diagnostiqué sur des critères biologiques et histologiques) chez les souris CASA/Rk ADAMTS13-/- en injectant de la Shigatoxine par voie intraveineuse** (Figure 21). Ils ont par ailleurs montré que la sous-unité B seule était suffisante pour déclencher le PTT chez les souris ADAMTS13-/-.[232] De manière cohérente, des souris ADAMTS13-/- et vWF-/- sont protégées de l'action de la Shigatoxine,[233] témoignant du fait que la libération brutale des UL-vWF par la dégranulation des CWP est essentielle au déclenchement du PTT chez les souris déficitaires en ADAMTS13.

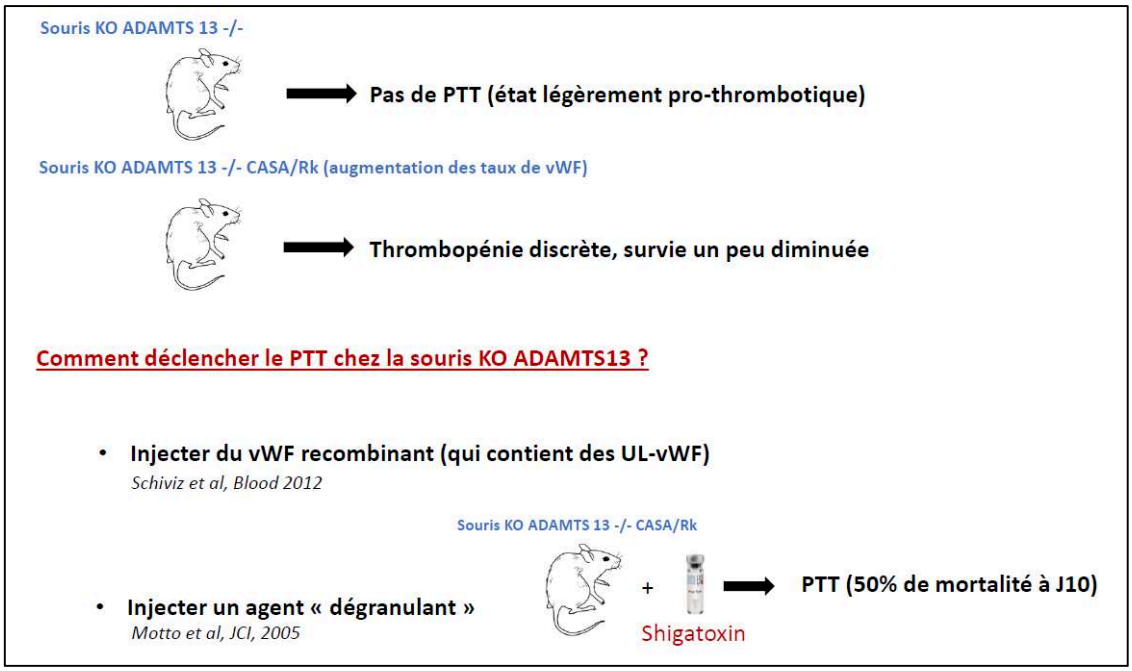


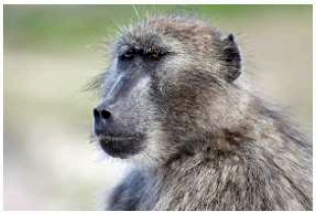
Figure 21: Déclenchement du PTT chez des souris KO ADAMTS13 par injection du vWF ou par induction de dégranulation endothéliale

D'autres modèles animaux de PTT ont été développés : un modèle de PTT congénital chez la souris[234] au cours duquel le PTT est déclenché par injection de vWF recombinant, et des modèles auto-immuns chez le rat[235] et chez la souris.[236,237] Dans tous ces modèles, même lorsque le déficit en ADAMTS13 est d'origine auto-immune, il est nécessaire de déclencher la microangiopathie par une injection de vWF recombinant ou par injection de Shigatoxine. Il est possible que chez les souris, le déficit en ADAMTS13 puisse être compensé par d'autres enzymes ayant possiblement une activité de clivage des multimères de vWF, telles que la plasmine,[208] mécanisme de compensation dépassé en condition de « suractivation endothéliale ».

Le Besnerais *et al*[238] se sont intéressés à l'atteinte endothéliale cardiaque dans un modèle murin de PTT, dans lequel la microangiopathie était déclenchée par injection de vWF recombinant chez des souris ADAMTS13-/-. Ils observent chez ces souris une diminution de la fonction systolique et de la perfusion cardiaque, associées à une altération de la vasodilatation NO-médiée induite par de l'acétylcholine des vaisseaux mésentériques et coronaires *ex-vivo*, témoignant d'une **dysfonction endothéliale**. Les cellules endothéliales cardiaques ont un **profil globalement pro-inflammatoire et pro-adhésif,** avec surexpression de VCAM (qui favorise la liaison des PNN) et d'E-sélectine (qui favorise la lésion des plaquettes) en immunohistochimie. Elles présentent une altération des mécanismes de synthèse et de signalisation du NO, avec diminution de l'expression d'eNOS cardiaque, et un profil pro-oxydant. Un état préalable de sénescence endothéliale ou la présence de facteurs cardiovasculaires pourrait aggraver la dysfonction endothéliale coronaire que les auteurs observent, et expliquer ainsi la fréquence des atteintes cardiaques chez les patients âgés.

3.1.4.2 Modèle du babouin

Le modèle de PTT développé par Feys *et al* chez le babouin (*Papio ursinus*)[239] semble, de prime abord, contredire ces données. Les auteurs ont généré des Ac monoclonaux murins anti-ADAMTS13 recombinante humaine, et un de ces Ac est un inhibiteur de l'activité ADAMTS13 *in vitro*. L'administration de cet Ac chez 6 babouins conduit à un effondrement de l'activité ADAMTS13 associé à des manifestations biologiques et histologiques de PTT (thrombopénie, hémolyse mécanique, thrombi typiques dans les organes cibles) mais sans retentissement clinique (Figure 22). Ainsi, contrairement au modèle murin, les auteurs concluent qu'il ne semble pas nécessaire d'avoir un second facteur déclenchant une dégranulation de l'endothélium pour induire un PTT chez le babouin.



Le babouin Chacma

Injection répétée d'Ac murin anti-ADAMTS13 humaine

→
- Confirmation de l'activité ADAMTS13 indosable
- Signes biologiques et histologiques de MAT
- Pas de signe clinique, pas de décès

Figure 22: le modèle du babouin

Néanmoins, Le Besnerais *et al*[238] notent que le niveau d'activation endothéliale n'est pas mesuré chez les babouins, et qu'il n'est pas exclu que les Ac anti-ADAMTS13 aient un effet activateur endothélial suffisant pour déclencher des lésions histologiques de MAT en condition de déficit en ADAMTS13. Par ailleurs, le caractère xénogénique des anticorps complexifie l'interprétation des données, car – bien que l'isotype contrôle ne soit pas pathogène chez les 5 babouins contrôles – les différences inter-espèces peuvent induire une majoration des boucles d'amplification qui sont détaillées plus loin. Le modèle du babouin a par ailleurs permis de tester avec succès dans un modèle pré-clinique proche de l'homme un anticorps ciblant le domaine A1 du vWF.

3.1.4.3 Modèle du zebrafish

Récemment, Zheng *et al.* ont développé un modèle de Zebrafish (*Danio rerio*) avec une invalidation bi-allélique du gène *adamts13* (par la technologie CRISPR-Cas9). Spontanément, ces poissons ont tendance à avoir un taux de plaquettes plus bas, une discrète hémolyse mécanique et un état prothrombotique[*] par rapport aux zebrafish wildtype (Figure 23).[240] Le PTT est déclenché chez les Zebrafish par l'injection d'histones riches en lysine, connus pour être des inducteurs de dégranulation calcium-dépendants des CWP.[241] La thrombopénie est plus sévère et les microthrombi riches en vWF plus présents dans le groupe de *zebrafish* ADAMTS13-/- que dans le wildtype. Cependant, l'analyse de survie de Kaplan-Meyer a indiqué un taux de mortalité à 2 semaines d'environ 30% dans le groupe ADAMTS13 -/- après injection des histones (vs 10% dans le groupe non invalidé pour ADAMTS13), ce qui correspond à un

[*] L'état prothrombotique était mesuré par le temps d'occlusion de la veinule caudale après lésion induite par du chlorure de Fer.

modèle de PTT beaucoup moins sévère que chez l'homme. Le phénotype prothrombotique (spontané ou induit par les histones) du zebrafish ADAMTS13-/- a, comme attendu, été corrigé chez les poissons avec un double knock-out ADAMTS13 -/- et vWF -/-.

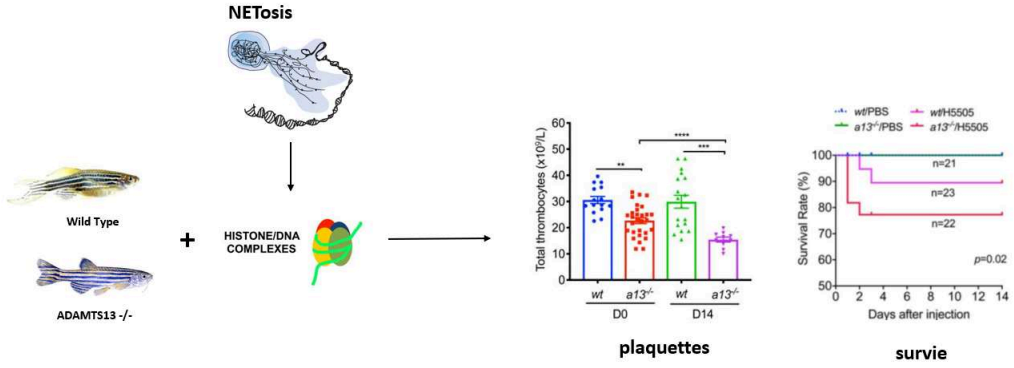


Figure 23: l'injection d'histones à des zebrafish KO ADAMTS13 induit une MAT de sévérité modérée

Comme souligné par Deforche *et al,*[237] le choix d'un bon modèle animal est difficile : si les expérimentations sur primates impliquent des difficultés éthiques et logistiques, la distance phylogénétique entre les rongeurs (et *a fortiori* les poissons) et les humains invite à une certaine prudence dans l'interprétation des résultats.

3.2 Quels facteurs déclenchants dans le modèle à « deux coups » ?

Le PTT est donc une MAT caractérisée par un déficit en ADAMTS13, dont le caractère pathologique est précipité par une activation de la cellule endothéliale. Dans cette partie, nous discutons des potentiels évènements à l'origine de l'activation endothéliale chez l'homme, et les mécanismes incriminés.

3.2.1 La grossesse

La grossesse[242,243] est classiquement un facteur déclenchant du PTT. De nombreux cas de PTTc ont été révélés pendant la grossesse[85] (alors que le déficit en ADAMTS13 est présent depuis la naissance). La grossesse est associée à un état transitoire d'hypercoagulabilité et d'hyper-agrégabilité, avec une majoration des taux des facteurs de coagulation, des taux de vWF circulant et une baisse concomitante de l'activité ADAMTS13.[244–246]

3.2.2 Les infections

3.2.2.1 Mécanismes supposés

Les infections sont souvent évoquées comme facteur déclenchant des microangiopathies thrombotiques. Un épisode pseudo-grippal est fréquemment rapporté dans les prodromes du PTT.[60] Plusieurs case-report ont identifié des PTT secondaires à des infections, notamment virales,[247,248] et une étude prospective menée par le centre de référence français des microangiopathies thrombotiques[249] retrouve une **histoire infectieuse dans les 2 semaines précédant le diagnostic chez 41% des 280 patients inclus**, avec un tropisme notamment digestif, puis urinaire, ORL, et broncho-pulmonaire, avec une documentation microbiologique chez 30% des patients.

Divers mécanismes sont susceptibles de faire le lien entre le processus infectieux et le déclenchement de l'épisode aigu de PTT :

- Certains virus, tels que le CMV, ont un **tropisme pour les cellules endothéliales** et peuvent ainsi directement induire leur activation.
- Les interférons de type I (IFNα et IFNβ) sont des molécules de l'immunité innée sécrétées en réponse à une infection virale et peuvent faire le lien entre l'épisode infectieux et le déclenchement de la microangiopathie. Les traitements par IFNα et IFNβ sont susceptibles de déclencher des tableaux de MAT,[250] voire de révéler d'authentiques PTT.[251] L'imputabilité des interférons de type I a été bien établie par Kavanagh *et al*[250] au cours d'un modèle murin, tandis que Jia[252] *et al* ont montré que les interférons de type I induisent une perte de la thromborésistance des HUVEC *in vitro*. D'autres cytokines (notamment l'IFNγ, le TNFα et l'interleukine-8) sont des inducteurs connus de la dégranulation des corps de Weibel-Palade.[253] De plus il a été

rapporté que l'IFNγ et le TNFα sont des cytokines qui down-régulent l'expression du gène codant pour ADAMTS13 dans le foie.[254]

- Les polynucléaires neutrophiles peuvent – en réponse à une infection – libérer des protéines dont certaines inhibent potentiellement le clivage du vWF par ADAMTS13.[255–257] Ils peuvent également **libérer des NETs** (*Neutrophil Extracellular Traps*) contenant notamment des nucléosomes dont le rôle d'activateur endothélial a été évoqué dans plusieurs MAT[258] (cf « boucles d'amplifications »).[*]
- Des polymorphismes du TLR9 (molécule de l'immunité innée anti-infectieuse présente à la surface des polynucléaires neutrophiles et des cellules endothéliales) sont surreprésentés chez les patients ayant fait un PTT et ne présentant pas le HLA-DRB1*11, et pourraient représenter un autre facteur de risque génétique.[249]

Si des auteurs rapportent avoir identifié l'antigène p24 du VIH au niveau de cellules endothéliales de la moelle osseuse chez une patiente infectée par le VIH et ayant présenté un tableau très évocateur de PTT,[259] ce cas est isolé et la physiopathologie du PTTi induit par le VIH n'est aujourd'hui globalement pas connue.

3.2.2.2 Cas particulier du SARS-CoV-2

Plusieurs cas de PTT (et autres microangiopathies thrombotiques) ont été décrits dans les suites d'une infection à SARS-CoV-2.[260,261] L'imputabilité de l'infection virale est toujours difficile à établir, mais on sait que le virus peut infecter et activer les cellules endothéliales,[262] et donc agir comme second « hit » chez des individus prédisposés. Nous avons participé à rapporter quelques cas de SHU concomitants d'infections à SARS-CoV-2 [263] (Annexe 3).

De manière peu surprenante, de nombreux cas isolés de PTT (et autres MAT) suivant des vaccinations contre le SARS-CoV-2 ont été publiés. Compte tenu du déploiement massif de ces vaccins dans le monde, il était inévitable que des MAT surviennent peu de temps après des vaccinations, sans qu'elles soient obligatoirement causalement en rapport. La manière de répondre à l'imputabilité de ces vaccins est une comparaison d'incidence. Dans ce sens, une équipe italienne[264] a suivi prospectivement une cohorte de 49 PTT, et la vaccination ne semble pas avoir déclenché plus de rechute que ce qui était observé habituellement[†].

[*] De plus, le Human Neutrophil Peptide 1-3 contient un motif RRY que l'on retrouve également dans le domaine spacer d'ADAMTS13, très immunogène. Il s'agit peut-être d'une explication partielle de la genèse de l'auto-immunité anti-ADAMTS13 chez certains patients (mécanisme *mimicry*).

[†] Il s'agit dans cette étude d'une comparaison d'incidence avec une cohorte historique, une étude cas-témoin n'était pas envisageable compte tenu du caractère obligatoire de la vaccination.

3.2.3 Les médicaments

De nombreuses drogues ont été décrites comme inductrices de MAT, notamment les anti-calcineurines, la mitomycine C, la gemcitabine, les anti-VEGF, la quinine.[60] Néanmoins ces MAT ne sont en règle générale pas associées à un déficit profond en ADAMTS13. Plusieurs mécanismes sont suspectés, et ils impliquent globalement tous une agression directe de la cellule endothéliale.

Seule la ticlopidine (un antiagrégant plaquettaire de la famille des thiénopyridines) a été identifiée comme induisant d'authentiques PTTi.[77] Le tableau de PTT survient dans les 2 à 12 semaines suivant l'introduction de la ticlopidine, et répond en général bien aux EP.[265] La physiopathologie de l'auto-immunité induite est incertaine, mais Mauro *et al*[266] ont constaté que la culture de cellules endothéliales *in vitro* avec des plasmas de patients atteints de PTT secondaires à la ticlopidine (ou par des doses pharmacologiques de ticlopidine) conduit à l'apoptose des lignées microvasculaires (à l'exception de la lignée pulmonaire et des lignées macrovasculaires), cette apoptose semblant liée à une altération de l'interaction de la cellule avec la matrice sous-endothéliale.

3.2.4 Les anticorps

Nous avons vu que dès 1982, Burns *et al* avaient identifié la fraction IgG des patients comme étant au moins en partie responsable de la cytotoxicité endothéliale. Plusieurs études ont mis en évidence des anticorps anti-cellules endothéliales dans les plasmas des patients atteints de PTT, ces anticorps ayant la propriété d'activer la dégranulation des lignées microvasculaires *in vitro.*[267] L'épitope ciblé par ces auto-Ac n'est pas toujours retrouvé, mais une proportion importante de patients (environ 70%) semble avoir des Ac anti-CD36 (GPIV),[222,223,268] CD36 étant un antigène retrouvé à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales microvasculaires.

Praprotnik *et al* émettent dès 2000 l'hypothèse d'une physiopathologie à 2 hits autoimmuns[267] : des auto-anticorps ciblant les cellules endothéliales microvasculaires vont activer ces cellules et induire une dégranulation des CWP ce qui conduit à l'accumulation des UL-vWF dans le contexte de déficit en ADAMTS13 d'origine auto-immune. Néanmoins, la proportion des patients présentant des anticorps ciblant les cellules endothéliales *in vitro* est une donnée controversée, une partie de ces anticorps ciblant le complexe majeur d'histocompatibilité.[269] Il est d'ailleurs connu, dans le cadre de la transplantation rénale allogénique, que les DSA (donor specific antibodies) sont responsables d'une agression aiguë ou chronique de la cellule endothéliale, les caractéristiques histologiques du rejet humoral (aigu et chronique) étant proches des lésions de MAT.[270]

Ren *et al*[271] montrent que l'injection d'anticorps xénogéniques anti-cellules endothéliales à des rats induit un tableau de MAT dose-dépendant et complément-dépendant : malgré l'absence de dépôt de C3 sur les tissus étudiés la thrombopénie disparaît lorsque le complément est déplété chez les rats par l'utilisation de venin de cobra, et aggravée par l'utilisation d'un anticorps anti-Crry, qui inactive un inhibiteur de la C3 convertase alterne. En outre, la MAT est plus sévère en cas de sensibilisation préalable par des IgG de souris. Le

tableau clinique présenté par les rats est néanmoins atypique car des microthrombi sont retrouvés dans le foie et le poumon, organes habituellement épargnés.

Des résultats récents de notre équipe sont en faveur d'un rôle pathogénique direct des anticorps anti-ADAMTS13 sur les cellules endothéliales : la fraction IgG des plasmas de patients atteints de PTTi en phase aiguë induit une dégranulation calcium-dépendante des cellules endothéliales (par rapport à IgG de patients contrôles ou des mêmes patients en rémission). Ces résultats sont reproduits en utilisant des Ac anti-ADAMTS13 purifiés, issus de patients atteints de PTT auto-immun.[229]

3.2.5 Autres

Récemment, et de manière plus anecdotique, plusieurs cas cliniques ont rapporté des tableaux de MAT (plutôt évocatrices de SHU) déclenchés par des morsures de serpent au Sri Lanka, notamment par *Hypnale hypnale*, de la famille des *Viperidae*.[272] L'analyse du venin de ce serpent montre la présence de phospholipase A2, de sérine-protéase, de métalloprotéinase, et de thrombin-like enzymes.[273,274] De même, l'envenimation par le Pseudonaja australien, de la famille des Elapidae, a également été incriminée dans le déclenchement de MAT, souvent associées à des coagulopathies de consommation.[275] D'autres facteurs déclenchants ont été décrits, tels que des actes endovasculaires ou des chirurgies lourdes.[276] Ci-dessous la Figure 24 récapitule l'implication de divers facteurs déclenchant et les conséquences phénotypiques endothéliales.

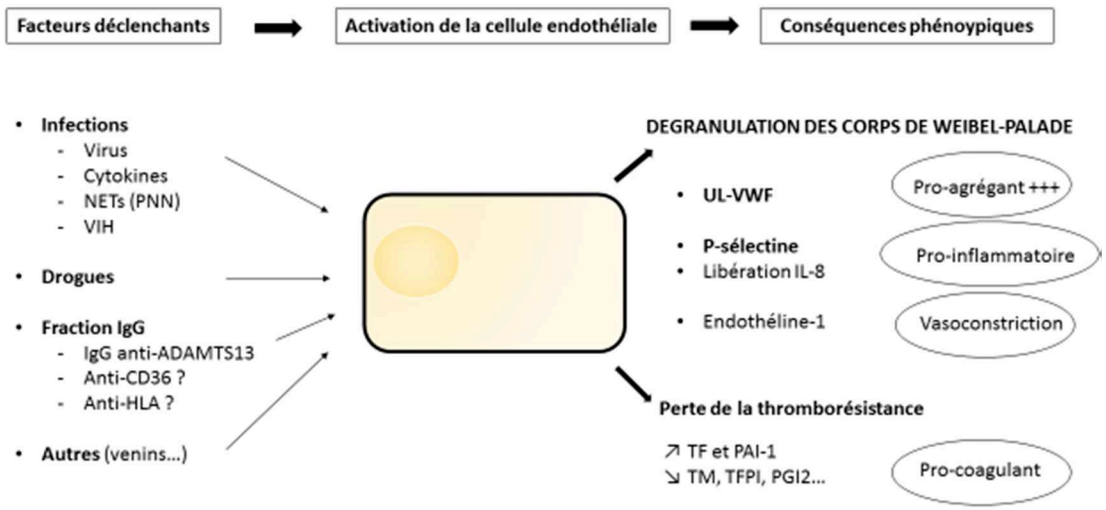


Figure 24: Schéma récapitulant les différents facteurs déclenchant l'activation endothéliale avec les conséquences phénotypiques

3.3 Les boucles d'amplification de l'agression endothéliale

3.3.1 Le système du complément

3.3.1.1 Présentation succincte du système du complément

Le complément est un système de défense archaïque* appartenant à **l'immunité innée** et composé de **protéines s'activant en cascade** sous le contrôle de molécules régulatrices (Figure 25).[277] Au total, on compte plus de 35 protéines du « système du complément », principalement synthétisée par le foie, les molécules du complément représentant 5% des protéines plasmatiques.

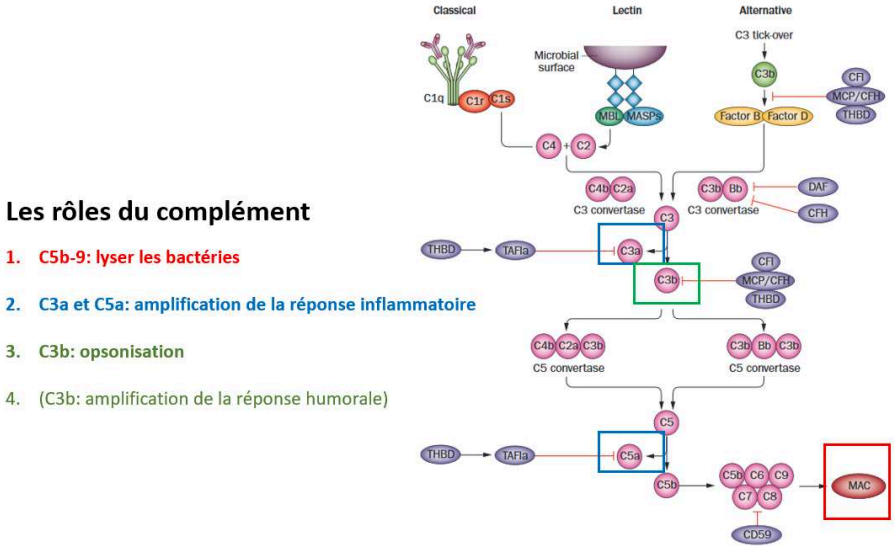


Figure 25: Cascade d'activation du complément (adapté de Noris, M. *et al*. Nat. Rev. Nephrol. 2012[278])

L'activation du complément conduit à 3 conséquences principales : **i) la lyse des agents pathogènes par l'intermédiaire du C5b9, ii) la clairance des cellules en apoptose notamment par l'opsonisation par le C3b et iii) l'amplification de la réponse inflammatoire (rôle des anaphylatoxines C3a et C5a)**. La cascade protéique peut être initiée par **3 voies distinctes** : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne. Cette dernière a la particularité d'être activée à bas bruit de manière permanente par hydrolyse spontanée du C3 et nécessite d'être régulée par des molécules inhibitrices solubles (telles que le facteur H et le facteur I) et membranaires (telles que le MCP, CD55 et CD59) La Figure 26 reprend la plupart des

* Le système du complément (ou son équivalent ancestral) serait apparu dans le vivant il y a plus de 500 millions d'années, ce qui en fait un système protéique extrêmement conservé.

régulateurs du complément, et la Figure 27 illustre la manière dont les régulateurs agissent, notamment pour prévenir l'activation de la voie alterne à la surface des cellules de l'hôte.*

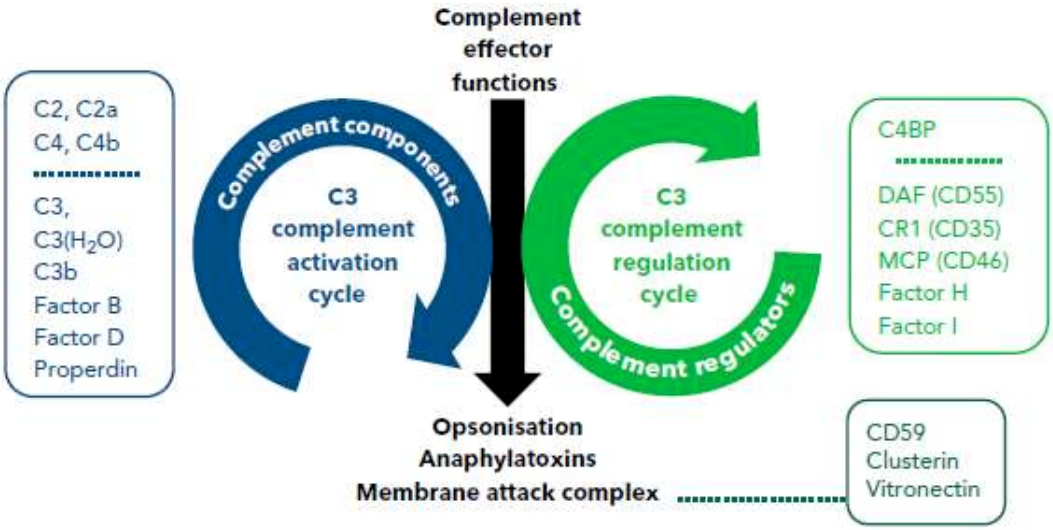


Figure 26: Le C3 est la protéine centrale de la cascade du complément (adapté de Schmidt *et al*, Blood 2022[280])

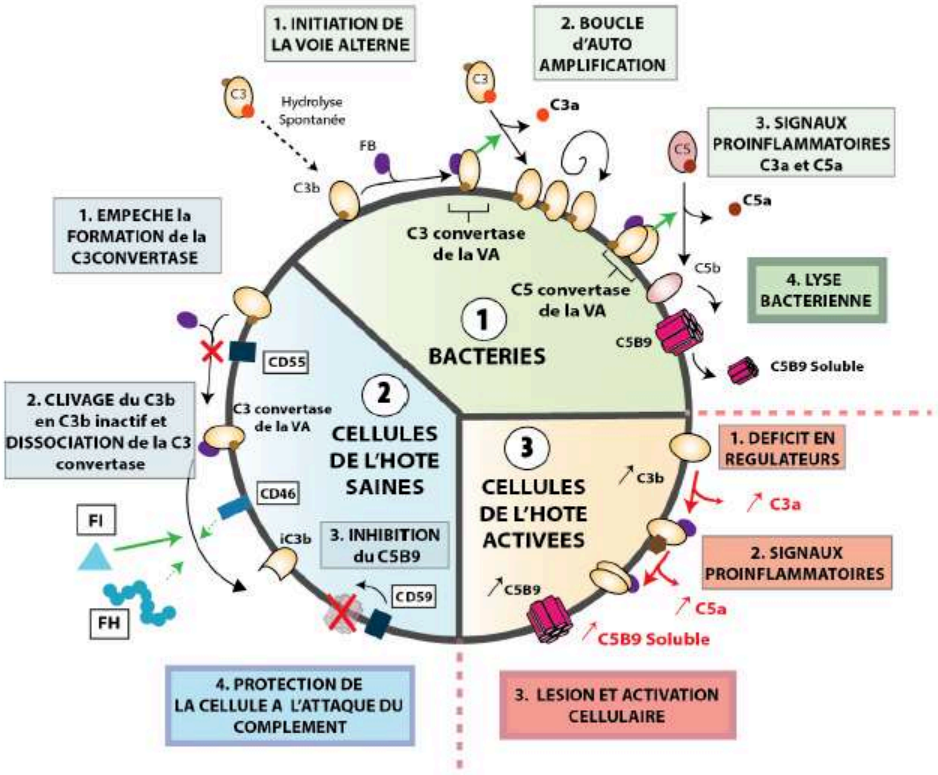


Figure 27: Activation et inhibition du complément en fonction des différentes surfaces cellulaires (figure aimablement fournie par le Dr Juliette Léon)

* Manne *et al* ont récemment proposé dans Blood[279] un schéma modifié de la cascade du complément, notamment dans la partie terminale (avec l'absence de C5 convertase à proprement parler).

3.3.1.2 Implication du complément dans d'autres MAT

3.3.1.2.1 Le SHU atypique

Le SHU dit atypique est une microangiopathie thrombotique dont l'atteinte est principalement rénale, et dont la physiopathologie récemment comprise constitue un modèle archétypal de pathologie de la voie alterne du complément.[281] Il semblerait que l'activation de la voie alterne se fasse essentiellement sur les *surfaces cellulaires* au cours du SHU atypique et non pas dans la phase circulante (à l'opposé des glomérulopathies à dépôts de C3, ou l'activation semble avoir lieu davantage dans la phase circulante). On retrouve chez environ 60% des patients des mutations inactivatrices de protéines régulatrices de la voie alterne (CFH, CFI, MCP) ou un auto-anticorps anti-CFH, ou encore des mutations gain de fonction des protéines activatrices (C3, CFB).[282,283] Cette **activation dérégulée de la voie alterne** va agresser la cellule endothéliale, souvent via un facteur déclenchant, tel que l'altération du glycocalyx ou la libération d'hème. Cela conduit à un phénotype pro-agrégant, procoagulant et pro-inflammatoire de l'endothélium rénal, aboutissant à la formation de microthrombi dans le rein, notamment au niveau glomérulaire (Figure 28). **L'eculizumab**, un anticorps monoclonal ciblant la fraction C5 du complément, a remarquablement amélioré le pronostic du SHU atypique.*

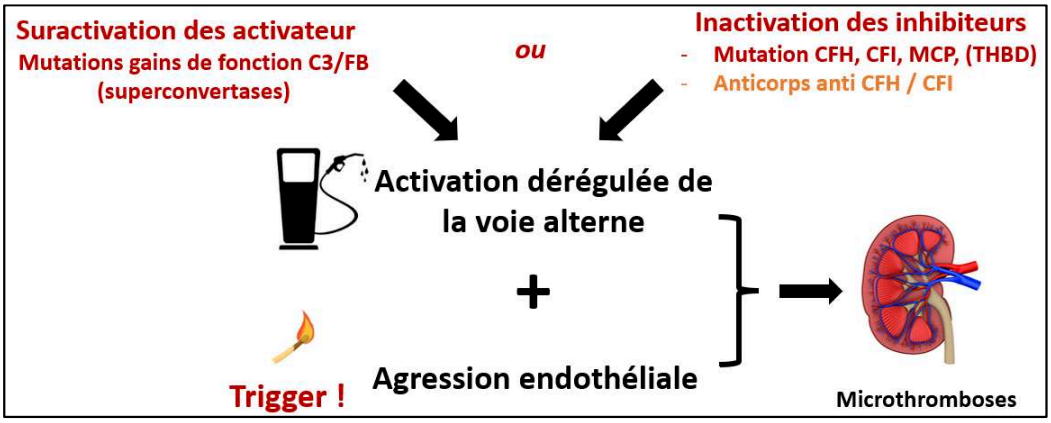


Figure 28: Dans le SHU atypique, une agression endothéliale sur un terrain d'activation dérégulée de la voie alterne du complément conduit à des microthromboses diffuses dans le rein

3.3.1.2.2 Le syndrome catastrophique des antiphospholipides

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) est une maladie caractérisée par l'association de thromboses (veineuses, artérielles, microcirculatoire) ou d'évènements obstétricaux avec des anticorps antiphospholipides (ACC et/ou anti-β2-gp1 et/ou anti-cardiolipines), la présence de ces anticorps devant être confirmée à 12 semaines. Le SAPL est

* Une étude très récente a récemment confirmé l'efficacité de l'eculizumab dans le SHU atypique. Les auteurs ont en effet montré la très nette supériorité (en termes de survie sans insuffisance rénale terminale) de l'eculizumab par rapport aux traitements historiques chez les patients atteints de SHU atypique complément-médié, en appariant les patients sur les anomalies génétiques retrouvées. Ils montrent de plus que i) une rechute du SHU est peu probable en l'absence de variant pathogène identifié ; ii) certains gènes sont associés à des formes de SHU atypique réfractaires, notamment DGKE et des gènes du métabolisme de la cobalamine (MMACHC, MTR), et iii) que les infections invasives à méningocoques demeurent une complication malgré la vaccination à l'antibioprophylaxie.[284]

fréquemment associé au lupus systémique.[285] Le syndrome catastrophique des antiphospholipides (CAPS) est une forme particulièrement sévère et qui s'apparente à une MAT, avec formation de thrombi diffus dans la microcirculation (et d'ailleurs 30% des patients présentent de l'hémolyse). Les tableaux de CAPS surviennent fréquemment à la faveur d'un facteur déclenchant (notamment une chirurgie, une infection, un défaut d'anticoagulation). Certains auteurs ont d'ailleurs proposé qu'une diminution modérée d'ADAMTS13 pouvait favoriser les évènements thrombotiques en présence d'antiphospholipides (APL).[286]

Il a été monté que les APL peuvent activer l'endothélium de 2 manières différentes (Figure 29) :

- **Rôle direct activant l'endothélium**, et donc augmentant sa thrombogénicité (notamment par l'expression du facteur tissulaire).[287,288]. Par ailleurs, les APL activent directement les plaquettes et les leucocytes.
- **Rôle d'activateur complément médié** : l'activation de la voie classique (et possiblement de la voie alterne) par les anti-β2-gp1 va induire des dépôts de C3b et majorer l'agression cellulaire par l'action du C5a et du C5b9.[280] Les patients atteints de CAPS ont beaucoup plus fréquemment des signes d'activation du complément que les SAPL.[289]

De façon cohérente, l'eculizumab est maintenant proposé pour les formes sévères de CAPS.[285,290]

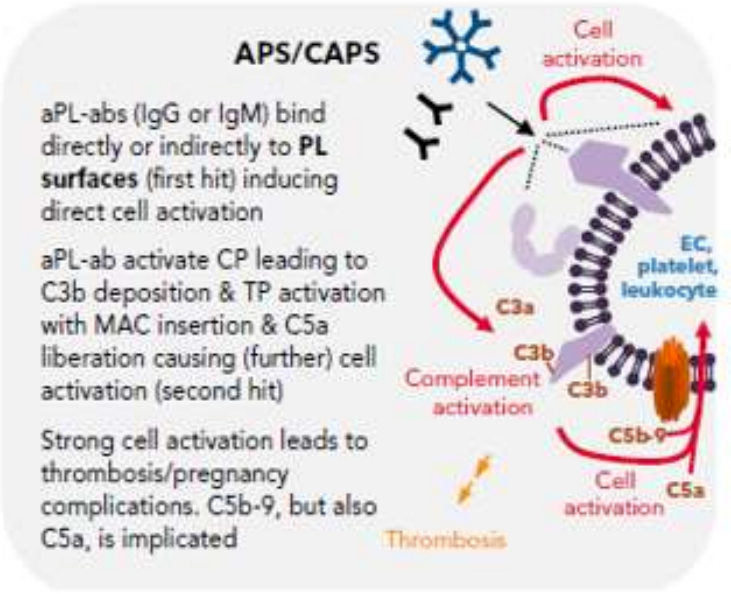


Figure 29: Les APL induisent une activation endothéliale directe et complément-médiée (adapté de Schmidt *et al*, Blood 2022)[280]

3.3.1.2.3 La Crise rénale sclérodermique

La crise rénale sclérodermique est une complication rare, aiguë et potentiellement sévère de la sclérodermie systémique. Elle se manifeste essentiellement comme une insuffisance rénale aiguë avec hypertension artérielle majeure. Une activation endothéliale a clairement été identifiée au cours de cette pathologie.[291] L'agression endothéliale semble plutôt médiée par la voie classique. Les patients sclérodermiques présentent une

consommation du C3 et du C4 mais cette consommation ne semble pas associée à la crise rénale,[292] et la présence de C4d et de C5b9 au niveau des cellules endothéliales artériolaires rénales.[293] Des cas d'amélioration sous Eculizumab ont été rapportés,[294] mais ces cas sont épars, non homogènes, et ce traitement n'est à l'heure actuelle pas recommandé dans cette indication. Le Bosentan, antagoniste des récepteurs de l'endothéline semble en revanche prometteur.

3.3.1.2.4 Autres

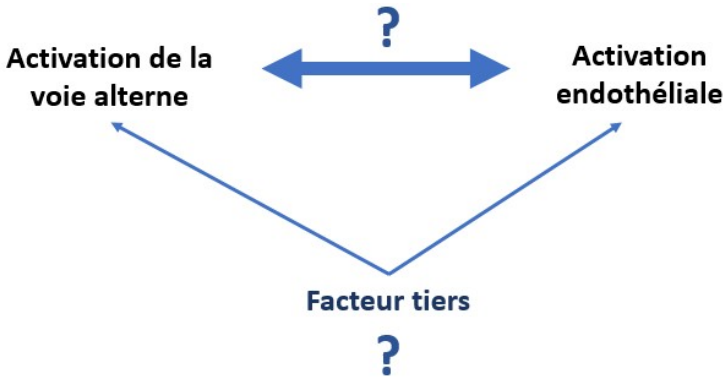
Des données sont également en faveur de l'implication du complément dans le SHU typique,[295,296] la pré-éclampsie,[297] et les MAT satellites de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (ces dernières sont détaillées plus loin).[*] Ainsi, le complément semble impliqué à des degrés divers dans la plupart des microangiopathies, il paraît donc logique d'étudier son rôle au cours du PTT.

Le rôle du complément est bien établi pour d'autres maladies aux manifestations très différentes (hémoglobinurie paroxystique nocturne, déficit isolé en CD59, l'anémie hémolytique à anticorps froids), mais qui ont en commun des événements thrombotiques.[280]

3.3.1.3 Signes indirects de l'implication du complément au cours du PTT

Plusieurs études ont montré des signes d'activation de la voie alterne du complément au cours du PTT. Les patients atteints de PTT en phase aiguë ont en effet des taux de C3a, C5a[298] et C5b9 soluble[299] élevés, ces taux se normalisant pendant la rémission. Cette donnée a récemment été confirmée dans une étude évaluant les paramètres d'activation endothéliale et les paramètres d'activation du complément.[300] Les taux de C3a, C5a et de C5b9 semblent significativement plus hauts chez les patients qui décèdent par rapport à ceux qui survivent.[301] Les échanges plasmatiques permettent de faire baisser les taux plasmatiques des anaphylatoxines et du C5b9 soluble. Néanmoins, ces taux sont probablement moins élevés que dans le SHU atypique.[302] Si l'activation de la voie classique du complément par des complexes immuns [ADAMTS13-Ac anti-ADAMTS13] a été suspectée, les différents auteurs s'accordent aujourd'hui pour dire que seule la voie alterne du complément semble impliquée. Notons d'ailleurs que les Ac anti-ADAMTS13 sont majoritairement des IgG4, qui n'activent pas la voie classique. Tati *et al*[303] rapportent des dépôts de C3 et de C5b9 dans le cortex rénal de patients atteints de PTT et identifient des dépôts de C3 et de C9 sur les microvésicules endothéliales générées *in vitro* par les plasmas des patients. De plus, Mikes *et al*[304] rapportent une corrélation statistique entre le taux de C3 convertase alterne et la dégranulation endothéliale mesurée dans cette étude par le taux de carboxyterminal pro-endothéline-1. Mais il est difficile de conclure à un lien de causalité, tant sont nombreux les facteurs confondants : en effet il existe possiblement des phénomènes « source » causalement reliés à l'activation de la voie alterne du complément et l'activation endothéliale.

[*] Certains auteurs proposent d'ailleurs l'utilisation de l'eculizumab dans certaines formes sévères (notamment neurologique et cardiaque) de SHU typique, mais ces données sont controversées.



3.3.1.4 les UL-vWF sont une plateforme d'activation de la voie alterne du complément

Néanmoins, l'activation de la voie alterne du complément ne semble pas être qu'un épiphénomène au cours du PTT mais bien un acteur pathogénique de la microangiopathie. Tati *et al*[303] ont montré que l'injection de Shigatoxine à des souris induit d'importants dépôts glomérulaires de C3 seulement dans le cas où les souris sont ADAMTS13-/-. Bettoni *et al*[299] ont incubé des cellules endothéliales microvasculaires avec des sérums de patients atteints de PTTc en phase aiguë et constaté que ces derniers induisent des dépôts de C3 et de C5b9, mais pas de dépôts de C4 sur les cellules endothéliales, avec une intensité comparable à celle observée en cas de SHU atypique. De manière remarquable, ces dépôts étaient corrigés par l'adjonction d'ADAMTS13 recombinante, sans que l'ADAMTS13 ne diminue intrinsèquement la formation de C3 convertase alterne.

Turner *et al*[305] mettent en évidence **une colocalisation entre les constituants de la voie alterne (particulièrement le C3) et les UL-vWF** (Figure 30), qui sera précisée par Bettoni *et al*[299] comme une interaction entre le C3b et le domaine A2 du vWF, conduisant à la formation des C3- et C5-convertases alternes jusqu'au complexe d'attaque membranaire. Cette équipe montre par la suite que la formation de thrombi induite par les sérums des patients PTT *in vitro* en condition de culture dynamique est corrigée par l'adjonction d'ADAMTS13 recombinante mais également par l'inhibition de l'activation du complément. Certaines données[306] sont en faveur du fait que les UL-vWF perdent la capacité qu'ont les multimères « normaux » du vWF à réguler l'activation de la voie alterne en agissant comme cofacteur du CFI.

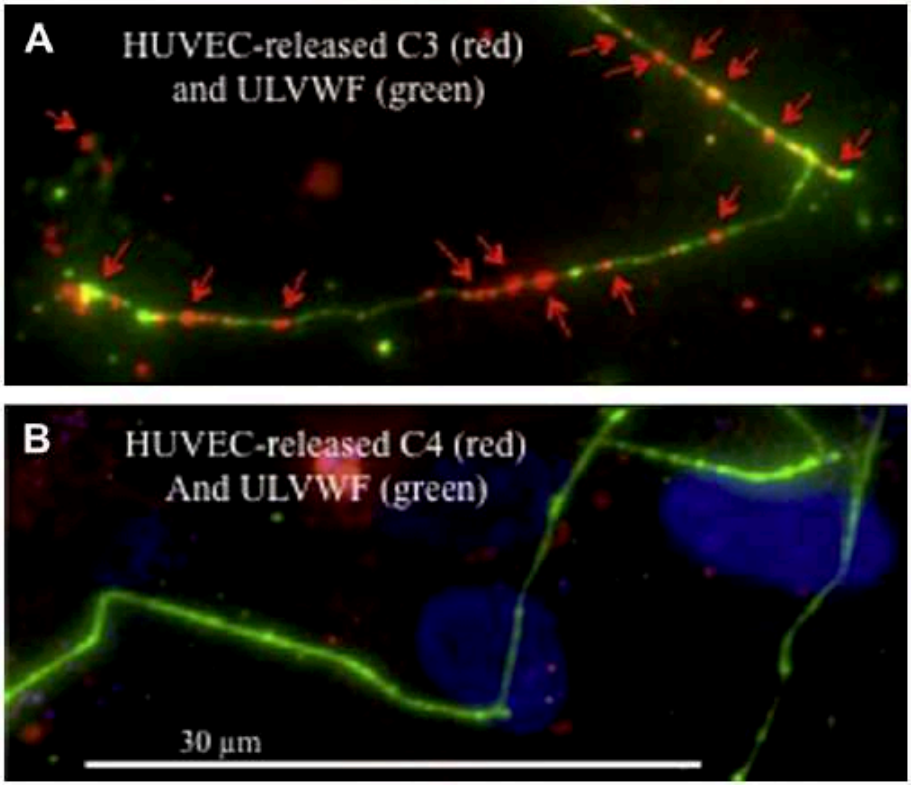


Figure 30: Colocalisation entre les UL-vWF et le C3 (adapté de Turner *et al*, 2015)[305]

Récemment, Zheng *et al*[307] ont montré que si les souris KO pour le gène ADAMTS13 et les souris KO hétérozygote pour le gène CFH étaient asymptomatiques, le croisement des deux lignées induit l'apparition d'un tableau de MAT sévère, traduisant un effet synergique du déficit en ADAMTS13 et des mutations de la voie alterne du complément dans ce modèle.

Bettoni *et al* proposent une élégante synthèse mécanistique[299] (Figure 31) : chez un patient atteint de PTT, les UL-vWF libérés lors de la dégranulation endothéliale vont s'accumuler et former une **plateforme permanente d'activation pour la voie alterne du complément** allant jusqu'à la formation de C5a et de C5b9. Ceux-ci induisent la dégranulation calcium-dépendante des CWP et donc la libération d'UL-vWF, créant ainsi une boucle d'amplification.[308] Le C5a induit de plus une **inactivation de la thrombomoduline** en se fixant sur le récepteur endothélial du C5a-R, ce qui participe à la thrombogénicité. L'inactivation de la thrombomoduline augmente localement l'activité de la thrombine, enzyme inactivatrice d'ADAMTS13.[309] De plus la thrombomoduline est un régulateur « non conventionnel » du système du complément : elle agit comme cofacteur du CFH et du CFI pour inactiver le C3b et agit comme cofacteur du TAFI qui inactive le C3a et le C5a[310]. L'inactivation de la thrombomoduline va ainsi s'intégrer à une boucle d'amplification de l'activation endothéliale par le complément.

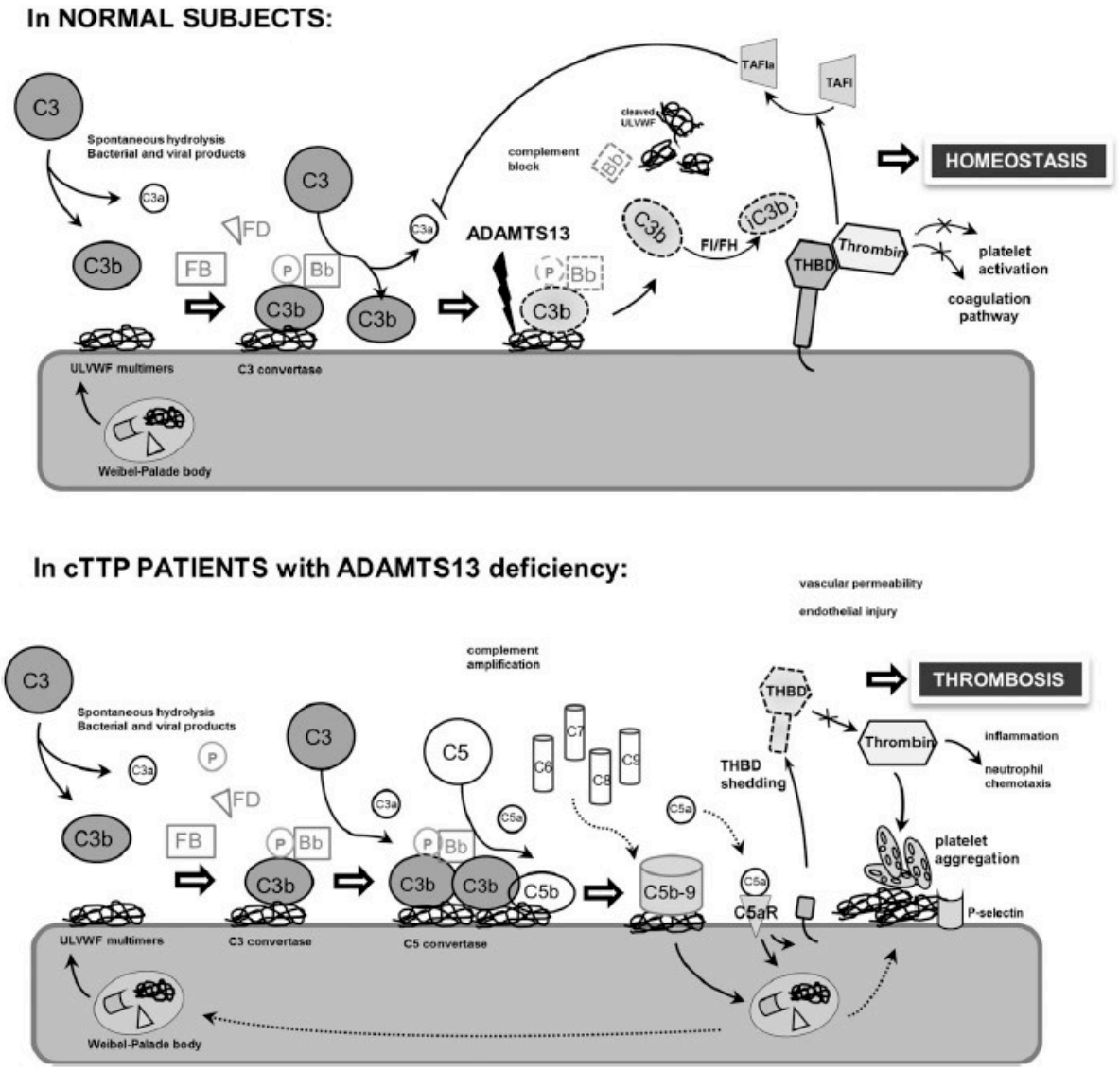


Figure 31: Synthèse mécanistique proposée par Bettoni *et al*[299]

3.3.1.5 La P-sélectine endothéliale

La P-sélectine endothéliale est un autre composant majeur des CWP exprimée en cas d'activation endothéliale. La P-sélectine est une molécule d'adhésion plaquettaire et leucocytaire,[311] et peut également activer la voie alterne du complément. Ainsi, la P-sélectine peut participer à une boucle d'amplification de l'activation endothéliale de plusieurs manières. Premièrement, la P-sélectine exprimée par l'endothélium va lier la fraction C3b[310,312] et ainsi participer à l'activation de la voie alterne du complément, aboutissant – comme vu précédemment – à la formation de C3a, C5a et de C5b9 qui vont activer l'endothélium, amplifiant ainsi l'expression de la P-sélectine.[308,313] De plus l'expression de la P-sélectine favorise le recrutement des PNN, qui vont participer à l'agression endothéliale. Ruiz-Torres *et al*[314] ont montré en 2005 que les PNN des patients atteints de PTT en phase

aiguë sont plus actifs et plus cytotoxiques que ceux issus des patients en rémission ou des patients contrôles (le pouvoir cytotoxique étant notamment apprécié sur la libération des espèces réactives de l'oxygène). Ils montrent par ailleurs que les sérums des patients PTT en phase aiguë activent les PNN, qu'ils majorent l'expression de la P-sélectine endothéliale, et qu'ils induisent une perte de la thromborésistance. De manière intéressante, ils montrent que tous ces effets sont complément-dépendants, le complément étant dans cette étude inhibé par la chaleur ou le sCR1. Enfin, la P-sélectine est également exprimée par les plaquettes activées, et pourrait servir de plateforme d'activation de la voie alterne du complément.[315]

3.3.1.6 Cibler le complément au cours du PTT

L'eculizumab a été exceptionnellement utilisé pour traiter des PTT réfractaires avec des résultats favorables, un cas étant une forme mixte PTT-SHU atypique (présence d'Ac anti-ADAMTS13 et d'Ac anti-CFH)[316,317] et un cas étant un PTTc,[318] deux autres cas étant des PTTi présentant des variants du CFH, CFI et du C3 à l'état hétérozygote.[319] Néanmoins ces quelques cas cliniques isolés ne permettent en aucun cas de proposer ce traitement actuellement aux patients atteints de PTT.

3.3.2 L'hémolyse

L'hémolyse intravasculaire est évoquée depuis plusieurs années comme une boucle d'amplification de l'agression endothéliale au cours des MAT. En effet la présence d'hémoglobine libre induit une consommation du NO[320] et la production d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui aggrave la dysfonction endothéliale[321] et favorise la dégranulation des CWP.[322] De plus, l'hémoglobine participerait à diminuer l'activité ADAMTS13.[323] La libération d'hème a d'ailleurs été évoquée comme facteur pouvant déclencher les poussées de SHU atypiques sur un terrain prédisposant. Elle induit directement la dégranulation des CWP en favorisant l'activation de la voie alterne du complément à la surface endothéliale (cet effet serait au moins en partie de manière TLR4-dépendante), et en stabilisant l'interaction homophilique C3-C3 dans la phase circulante (Figure 32).[324,325] Notre équipe a pu montrer que les patients atteints de PTT en phase aiguë ont des taux élevés d'hème libre (conséquence de l'hémolyse) par rapport à des patients contrôles. *In vitro*, le traitement par hémopexine, qui se lie à l'hème libre, permet de légèrement freiner le flux calcique intracellulaire avec une diminution modérée de la libération d'endothéline-1 et de vWF, confirmant un effet amplificateur – bien que probablement modeste – de l'hème libre sur l'activation endothéliale[229] (Annexe 2).

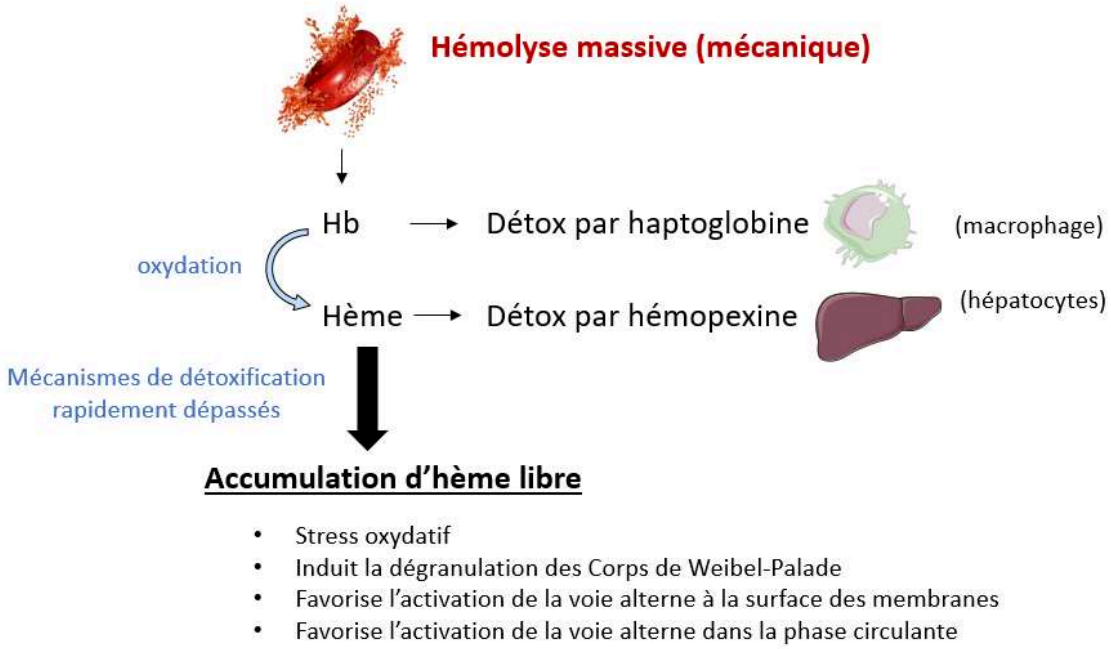


Figure 32: L'hémolyse massive induit une accumulation d'hème libre, qui participe directement et indirectement à l'agression endothéliale

3.3.3 Les nucléosomes

En réponse à des stimuli inflammatoires ou infectieux, les polynucléaires neutrophiles peuvent libérer des NETs (Neutrophil Extracellular Traps),[326] qui sont constitués de nucléosomes (ADN et histones) et de protéines telles que la myéloperoxydase, la neutrophil-elastase et la cathepsine G. Ces NETs ont un rôle anti-infectieux car ils permettent de piéger les bactéries, mais ils semblent également avoir une action pro-thrombotique.[327] Les histones peuvent induire une thrombopénie de consommation chez la souris.[328] Fuchs *et al* ont montré en 2012 que des taux élevés d'ADN circulant et de myéloperoxydase étaient associés à une activité ADAMTS13 basse et des plaquettes basses chez les patients présentant un tableau de MAT, c'est-à-dire à un PTT en phase aiguë,[329] avec normalisation de ces taux lors de la rémission. Par ailleurs, les nucléosomes semblent impliqués dans d'autres MAT, notamment au cours du SHU typique (au cours duquel les nucléosomes participent à l'agression on endothéliale),[330] et les MAT satellites d'allogreffe de cellules souches, comme détaillé plus bas). L'ADN et les histones peuvent également être libérés à l'occasion de dégâts tissulaires ischémiques,[258] créant ainsi une boucle d'amplification pro-thrombotique. Notre équipe a pu récemment confirmer que les patients atteints de PTT en phase aiguë avaient des taux élevés de nucléosomes circulants. Le traitement par Annexin V, qui freine la signalisation induite par les histones via la phosphatidylsérine, permet de diminuer de manière modeste mais significative le flux calcique intracellulaire et la dégranulation endothéliale induits *in vitro* par les plasmas de patients PTT, témoignant d'un rôle potentiellement amplificateur des

nucléosomes dans le déclenchement ou l'entretien du processus de microangiopathie[229] (Annexe 2).

La Figure 33 résume l'implication des boucles d'amplification de l'activation endothéliale au cours du PTT

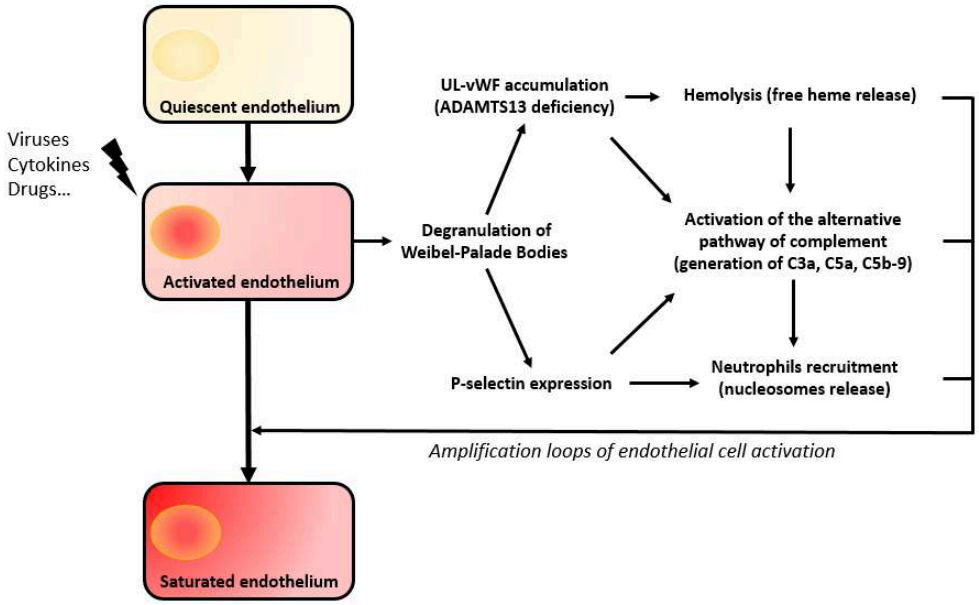


Figure 33: Le complément, l'hème et les nucléosomes sont des boucles d'amplification au cours du PTT

3.4 Un modèle d'étude de l'agression endothéliale : les MAT satellites d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Les MAT sont une complication fréquente et grave de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (TA-TMA, pour Transplantation-associated TMA). L'incidence des TA-TMA est variable selon les études (6 à 39%) qui surviennent après un délai moyen de 44 jours, typiquement dans les 3 mois suivant la greffe.[331] Ces MAT ne sont pas associées à un déficit profond en ADAMTS13. L'atteinte rénale est souvent au premier plan (HTA sévère, protéinurie glomérulaire, élévation de la créatinine), mais les patients peuvent également présenter une atteinte artériolaire pulmonaire dont la complication principale est l'HTAP, grevée d'un pronostic sombre.[332] Des atteintes digestives, neurologiques et des polysérites sont également décrites. Le diagnostic est souvent difficile dans ce contexte de soins intensifs hématologiques compte tenu des nombreuses causes possibles de cytopénies et de défaillance d'organes : iatrogénie, infections, Graft versus Host Disease (GVHD)…

La physiopathologie est complexe, imparfaitement connue, mais illustre bien les conséquences majeures que semblent avoir des agressions endothéliales cumulatives associées à des boucles d'amplifications (Figure 34).

Le conditionnement pré-greffe – dont il existe plusieurs protocoles – est une procédure agressive, qui fait appel à des drogues très toxiques pour l'endothélium (telles que la fludarabine, le busulfan) et parfois à une irradiation corporelle totale. De plus, l'immunodépression est majeure au cours de la procédure d'allogreffe et la plupart des patients vont présenter des infections systémiques, virales, bactériennes ou fongiques. Les anticalcineurines (ciclosporine ou tacrolimus) sont très fréquemment utilisés dans les suites immédiates de l'allogreffe, en prévention du rejet et surtout de la GVHD. Les anticalcineurines induisent un phénotype de cellule endothéliale activée, prothrombotique et pro-inflammatoire avec baisse de la production de NO et de la prostacycline, augmentation de la sécrétion d'endothéline et thromboxane A2.[333] De manière intéressante, la ciclosporine semble par ailleurs augmenter l'activité de la majorité des métalloprotéinases matricielles endothéliales *in vitro,* sauf celle de MMP-2.[334] Cependant, les patients ayant tous des anticalcineurines au cours de la procédure d'allogreffe, il est difficile d'identifier formellement ces traitements comme des facteurs de risque.

Plusieurs publications récentes mettent en évidence le rôle majeur du complément au cours des TA-TMA. On retrouve fréquemment une prédisposition génétique affectant la voie alterne du complément (telles que des mutations hétérozygotes du CFH), parfois des Ac anti-CFH.[335,336] Le C5b9 soluble est fréquemment augmenté dans les TA-TMA.[337] Comme précédemment décrit, l'endothélium activé va exposer et libérer le vWF et la P-sélectine, qui peuvent agir comme boucles d'amplification. Contrairement au PTT, une activation de la voie classique du complément est également évoquée (notamment en raison de la présence de C4b sur les biopsies), et pourrait être induite par des anticorps spécifiques du receveur (RSA) ciblant des antigènes endothéliaux.[338]

Le rapport entre TA-TMA et GVHD aiguë est complexe. Les TA-TMA ont même été suspectées d'être des équivalents de GVHD endothéliales, tant les mécanismes et les causes semblent intriqués. Au cours de la GVHD, les cellules endothéliales semblent être la cible des lymphocytes CD8 cytotoxiques du donneur,[339] et plusieurs marqueurs d'agression endothéliale sont associés à un mauvais pronostic de la GVHD.[340,341] Les NETs peuvent constituer un lien entre TA-TMA et GVHD. Des taux élevés d'ADN double-brin circulant ont été associés à la survenue de TA-MTA et de GVHD,[342] les auteurs proposant que la libération d'IL-8 par l'endothélium lésé lors du conditionnement induise une NETose, qui va servir de plateforme à l'activation du complément.[343] De manière intéressante, les auteurs ont montré que les taux élevés d'ADN double-brin diminuaient lors du traitement de la MAT par eculizumab, sauf chez les patients qui présentaient une GVHD associée, témoignant d'une persistance de l'agression endothéliale. Néanmoins et malgré ces hypothèses intéressantes, il n'existe pas de lien causal établi à ce jour entre GVHD et TA-TMA.

Jodele *et al* se sont particulièrement intéressés à cette problématique de TA-TMA, et ont identifié 2 facteurs pronostics majeurs : une protéinurie > 30 mg/dL et un taux élevé de C5b9 soluble. Ils proposent l'utilisation d'eculizumab pour les patients présentant ces deux facteurs pronostiques au cours d'une TA-TMA.[332]



Figure 34: Le couple « stress sur terrain prédisposant » est impliqué dans des proportions variables dans d'autres MAT (adapté de Jodele *et al*)[336]

3.5 Le phénotype endothélial comme déterminant de la sélectivité des atteintes d'organes

Comment expliquer que le PTT atteint préférentiellement le cerveau et le cœur (et épargne quasiment toujours le foie et les poumons), tandis que le SHU touche préférentiellement le rein ? Un élément de réponse à cette question pourrait être **le couplage entre le phénotype endothélial local et la nature des activateurs endothéliaux** (Figure 35).

- Le foie et les poumons sont des organes dans lesquels le sang circule à faible **régime de pression**, avec des tensions pariétales faibles or nous avons vu que des fortes tensions pariétales sont nécessaires pour « dérouler » le vWF, et « décrypter » son site de liaison aux plaquettes. A l'inverse, le cerveau et le cœur sont des organes dans lesquels il existe un haut régime de pression.
- **L'endothélium glomérulaire** est mal protégé contre l'action du complément, et est particulièrement riche en **Globotriaosylceramide** (Gb3, le récepteur de la Shigatoxine). C'est l'une des raisons qui pourrait expliquer que le SHU (typique ou atypique) touche préférentiellement le rein.
- Nous avons rappelé précédemment que Mitra *et al*[224] avaient montré que les plasmas de patients PTT en phase aiguë (mais pas les plasmas contrôles) induisent *in vitro* l'apoptose des cellules microvasculaires d'origine cérébrale et rénale mais pas des cellules microvasculaires hépatiques et pulmonaires ni des cellules macrovasculaires, les macrovaisseaux, le foie et le poumon étant classiquement épargnés au cours du PTT.*

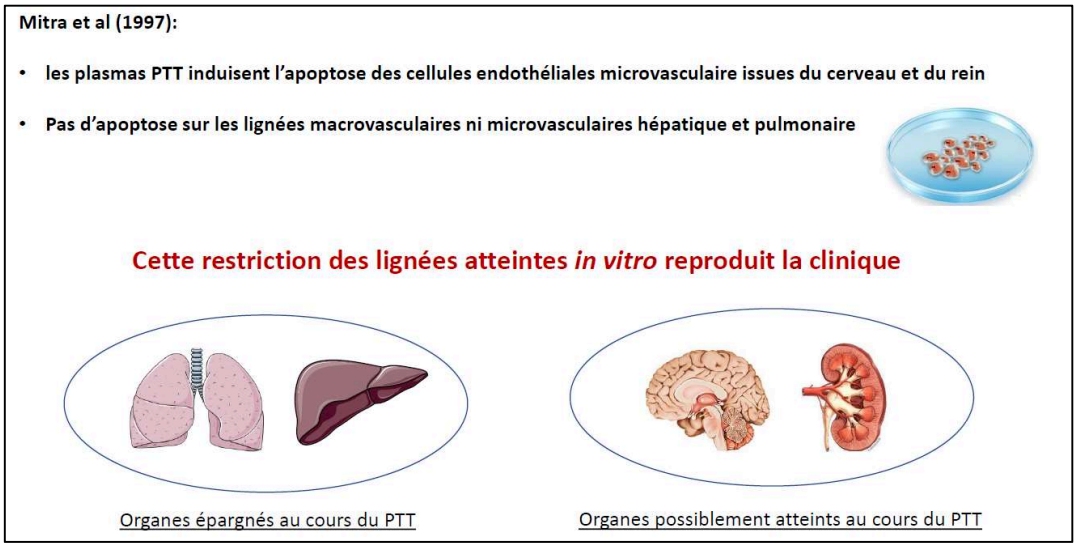


Figure 35: Le couplage phénotype endothélial - nature des activateurs est une piste pour comprendre le tropisme des atteintes d'organes

* Les auteurs de l'article « The endothelium, a primer » dans l'encyclopédie médicale en ligne nord-américaine « up to date » propose d'expliquer le tropisme microvasculaire du PTT par le fait que le CD36 n'est exprimé que dans le compartiment microcirculatoire, et non dans le compartiment macrocirculatoire.

3.6 Conclusion

Il est aujourd'hui connu que l'activation endothéliale chronique conduit à une dysfonction de l'endothélium, qui perd ses capacités de régulation de l'hémostase, de l'inflammation et du tonus vasomoteur au cours de maladies chroniques comme l'athéromatose. Mais dans certaines situations, telles que les MAT, une activation endothéliale aiguë semble être le facteur déclenchant une cascade incontrôlée de l'hémostase.

Comme relevé par Roumenina *et al,*[310] l'endothélium est à la fois une source majeure des acteurs de l'hémostase et du système du complément, et constitue en condition physiologique une barrière efficace contre une activation dérégulée de ces acteurs, notamment par l'existence de nombreuses molécules régulatrices, dont les fonctions sont parfois redondantes. Nous adhérons à la terminologie employée par ces auteurs, qui distinguent l'endothélium quiescent, l'endothélium activé de manière contrôlée (en réponse à divers stimuli, tels qu'une infection) et l'endothélium saturé, qui est une activation endothéliale dépassant les capacités de régulations. Ce stade de saturation peut survenir schématiquement dans deux types de situation : soit il existe une activation endothéliale d'une intensité si importante qu'elle dépasse les capacités de régulations physiologiques (ce type de processus est par exemple à l'œuvre au cours du choc septique), soit il existe une susceptibilité acquise ou innée de l'endothélium (comme un défaut de régulation de la voie alterne du complément ou un déficit en ADAMTS13) qui conduit une agression endothéliale classique à des conséquences majeures, avec un phénotype fortement pro-agrégant, procoagulant et pro-inflammatoire. L'endothélium devient alors la cible et l'acteur principal des boucles d'amplification à l'œuvre.

Au cours du PTT, nous suggérons que des facteurs endogènes (anticorps, cytokines, hème) ou exogènes (virus, drogue, toxine) induisent l'activation endothéliale initiale, conduisant à la dégranulation calcium-dépendante des CWP et à la libération des UL-vWF. Les facteurs déclenchants peuvent être cumulatifs, et possiblement associés à des facteurs aggravants (tels qu'une hémolyse ou une altération du glycocalyx) afin d'atteindre le stade d'activation endothéliale qui fait basculer l'équilibre dans le processus de microangiopathie. Il est également possible qu'une expression minimale de P-sélectine soit nécessaire à la surface des cellules endothéliales, les UL-vWF s'accrochant probablement à la P-sélectine membranaire et se déroulant suivant le flux sanguin,[344,345] démasquant les sites de liaison A1 au Gp1b plaquettaire, induisant la formation des microthrombi plaquettaire diffus. L'accumulation massive des UL-vWF et la formation des microthrombi vont participer directement à l'activation endothéliale, activer la voie alterne du complément et induire une hémolyse importante, tous ces facteurs agissant comme des boucles d'amplification de l'activation endothéliale. Il est également possible que les microvésicules endothéliales libérées par l'endothélium participent à l'aggravation du processus voire à une systématisation de la MAT. Enfin, une libération massive d'UL-vWF peut « consommer » une activité ADAMTS13 abaissée de manière constitutionnelle ou acquise, décompensant alors le terrain pro-thrombotique.[92]

Malgré les progrès thérapeutiques récents, le PTT reste une pathologie sévère. Nous avons montré qu'il existe de nombreux arguments cliniques et expérimentaux qui soutiennent l'hypothèse du modèle « à deux coups ». Ainsi, nous pensons qu'il existe un rationnel fort pour

inhiber de manière pharmacologique l'activation endothéliale au cours du PTT. En effet la dégranulation endothéliale des CWP, qui est au cœur de la physiopathologie, n'est pas ciblée spécifiquement par les traitements actuels. De plus, la localisation de l'endothélium à l'interface des tissus et du sang le rend rapidement et préférentiellement accessible aux drogues administrées de manière systémique. Enfin la plasticité de la cellule endothéliale laisse entrevoir des possibilités de modulation pharmacologique, faisant de l'endothélium une cible thérapeutique de choix.

4. Revue publiée

La troisième partie de cette introduction bibliographique a été publiée sous la forme d'une revue dans le ***Journal of Clinical Medicine*** **en janvier 2023** (IF : 4.96). Cette revue est présentée ci-dessous.

Journal of
Clinical Medicine

MDPI

Review

Is Endothelial Activation a Critical Event in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura?

Raphael Cauchois [1,2,*], Romain Muller [1], Marie Lagarde [2,3], Françoise Dignat-George [4], Edwige Tellier [2,3] and Gilles Kaplanski [1,2]

[1] Aix Marseille University, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, INSERM, INRAE, C2VN, CHU Conception, Internal Medicine and Clinical Immunology, 13005 Marseille, France
[2] French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies, 75571 Paris, France
[3] Aix Marseille University, INSERM, INRAE, C2VN, 13005 Marseille, France
[4] Aix Marseille University, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, INSERM, INRAE, C2VN, CHU Conception, Hematology Laboratory, 13005 Marseille, France
* Correspondence: raphael.cauchois@ap-hm.fr

Abstract: Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a severe thrombotic microangiopathy. The current pathophysiologic paradigm suggests that the ADAMTS13 deficiency leads to Ultra Large-Von Willebrand Factor multimers accumulation with generation of disseminated microthrombi. Nevertheless, the role of endothelial cells in this pathology remains an issue. In this review, we discuss the various clinical, in vitro and in vivo experimental data that support the important role of the endothelium in this pathology, suggesting that ADAMTS13 deficiency may be a necessary but not sufficient condition to induce TTP. The "second hit" model suggests that in TTP, in addition to ADAMTS13 deficiency, endogenous or exogenous factors induce endothelial activation affecting mainly microvascular cells. This leads to Weibel–Palade bodies degranulation, resulting in UL-VWF accumulation in microcirculation. This endothelial activation seems to be worsened by various amplification loops, such as the complement system, nucleosomes and free heme.

Keywords: thrombotic thrombocytopenic purpura; endothelial cells; Weibel–Palade bodies

check for updates

Citation: Cauchois, R.; Muller, R.; Lagarde, M.; Dignat-George, F.; Tellier, E.; Kaplanski, G. Is Endothelial Activation a Critical Event in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura? *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 758. https://doi.org/10.3390/jcm12030758

Academic Editors: Leonard A. Valentino and X. Long Zheng

Received: 4 November 2022
Revised: 13 January 2023
Accepted: 16 January 2023
Published: 18 January 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a rare and severe disease belonging to the thrombotic microangiopathies disorders and described for the first time in 1924 by Eli Moschcowitz. It is characterized by uncontrolled platelet aggregation and adhesion which will form microthrombi resulting in the clinical syndrome of TTP. Clinical presentation includes thrombocytopenia, mechanical hemolysis and organ damage. It can be fatal without prompt diagnosis and appropriate treatment [1]. Knowledge about TTP pathophysiology has considerably improved in recent decades: in 1982 Joel L Moake identified uncleaved von Willebrand Factor (VWF) multimers in patients with chronic relapsing TTP [2]. Nineteen years later, ADAMTS13 (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin-1 motifs, 13th member of the family) was related to the loss of function of the VWF multimers-cleaving metalloproteinase [3,4]. The severe ADAMTS-13 deficiency can be inherited as in congenital TTP (Upshaw–Schulmann syndrome [5]) or more commonly acquired due to inhibitory auto-antibodies against ADAMTS13 (i-TTP, for immune-mediated TTP) [6,7].

The current pathophysiological paradigm suggests that the ADAMTS13 deficiency leads to Ultra Large-VWF multimers (UL-VWF) accumulation on endothelial cells [8]. Flowing blood applies a tensile force that "unfolds" UL-VWF, which, therefore, form pro-thrombotic strings into micro vessels. They induce a massive platelet adhesion and aggregation with rapid generation of disseminated microthrombi, leading to the thrombotic microangiopathies characteristics triad: (i) organ ischemia, (ii) profound thrombocytopenia

and (iii) hemolytic anemia. Organ ischemia affect mainly central nervous system but also heart, digestive tract and occasionally kidney. Thrombocytopenia (often < 30 G/L) is often associated with hemorrhagic risk because of platelet's consumption in thrombi. Furthermore, recent research has shown that thrombocytopenia is aggravated by insufficient bone marrow production of young platelets [9,10]. Anemia is accompanied with schistocytes on blood smear due to mechanical erythrocyte fragmentation on thrombi.

Due to its clinical severity, patients with i-TTP require urgent treatment in intensive care unit. Daily therapeutic plasma exchanges (TPE), commonly used since the 80's, represent the cornerstone of acute phase management and have significantly improved outcomes by drastically reducing mortality from 90% to 20% two weeks after diagnosis [11]. TPE are very effective by providing exogenous ADAMTS13 contained in donor's plasma and by removing anti-ADAMTS13 antibodies. Due to the autoimmune pathophysiology, corticosteroids are systematically associated with TPE during the acute phase. Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody is another frontline therapy [12]. More recently, Caplacizumab, a nanobody inhibiting VWF-platelet interaction, provides an interesting protective effect during the acute phase [13–15]. Despite those recent therapeutic improvements, TTP remains a life-threatening disease with high morbidity [16] and relapse risk for patients who survive [17].

In addition to the central role of ADAMTS13 deficiency in TTP pathogenesis, the endothelial cells, which represent the main UL-VWF storage, have been long recognized as major actors in TMA and in TTP particularly [18,19]. Indeed, many TTP related studies have described endothelial damages, especially histopathological such as swelling/necrosis and subendothelial hyaline deposits, biomarkers association with endothelial activation and frequent environmental triggers. The existence of an endothelial activation during TTP acute phase is accepted by the scientific community. However, one question remains: is the endothelial activation a consequence of the micro-occlusive disease [20], i.e., an epiphenomenon, or is it a key initiating event that precipitates an individual susceptibility into an acute episode? Many clinical and experimental data support the hypothesis that endothelial activation is essential to the pathogenesis. This activation represents a "second hit" that induces a massive UL-VWF release into the microcirculation.

After a succinct presentation of the endothelium and the Weibel–Palade bodies, we will present elements that support or not this hypothesis. Then, we will discuss the nature of the suspected triggers and the existence of amplification loops increasing the severity degree of TTP.

2. The Endothelium

2.1. Endothelial Cells

The endothelium is a cellular monolayer that covers the luminal surface of the vascular tree [21]. Endothelial cells (ECs) are polarized through their actin cytoskeleton and constitute a dynamic interface between flowing blood (apical pole) and sub-endothelial tissues (basal pole). They play a central role in the regulation of major physiologic functions, such as hemostasis, vascular permeability, cellular and nutrient trafficking, inflammation, innate and adaptive immunity, vascular tone and angiogenesis.

Structure and function heterogeneity constitute key features of the endothelium. Depending on the vascular territory and vascular bed [22,23], endothelium presents a spatial phenotypic diversity. The morphology, secretory repertory and behavior of ECs differ between arteries and veins, and between microvascular (vessel size < 300 µm) and macrovascular (>300 µm) territories. Endothelial heterogeneity is also temporal: EC phenotype shows a high plasticity degree and phenotypical changes can occur in response to many physiological or pathological conditions, such as biomechanical signals, pH variations, hypoxemia, soluble mediators or cell–cell interactions.

2.2. Endothelial Activation

Quiescent ECs display a thromboresistant (anticoagulant and antiaggregant) and anti-inflammatory phenotype. They also protect flowing blood from the highly prothrombotic subendothelial matrix [24]. These features prevent spontaneous thrombi formation in blood vessels and result from antithrombotic molecules expression: TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), existing in transmembrane and soluble isoform, TM (Thrombomodulin), EPCR (Endothelial Protein C Receptor), t-PA (tissue-type Plasminogen Activator), NO (Nitric Oxide) and PGI2 (Prostacyclin). When exposed to various stress signals, such as cytokines, toxins, disturbed shear stress, etc., ECs acquire an "activated phenotype" which is prothrombotic (Figure 1). Consequences of this activation are multiple: VWF-multimers released from the Weibel–Palade bodies, reduced expression of the above-mentioned thromboresistant molecule and increased expression of Tissue Factor (TF), the main activator of the extrinsic coagulation pathway and Plasminogen-Activator Inhibitor-1 (PAI-1). Furthermore, activated ECs also acquire a pro-inflammatory phenotype characterized by leukocyte receptor expression, such as P-selectin, and an increase in intercellular permeability facilitating leukocyte trafficking.

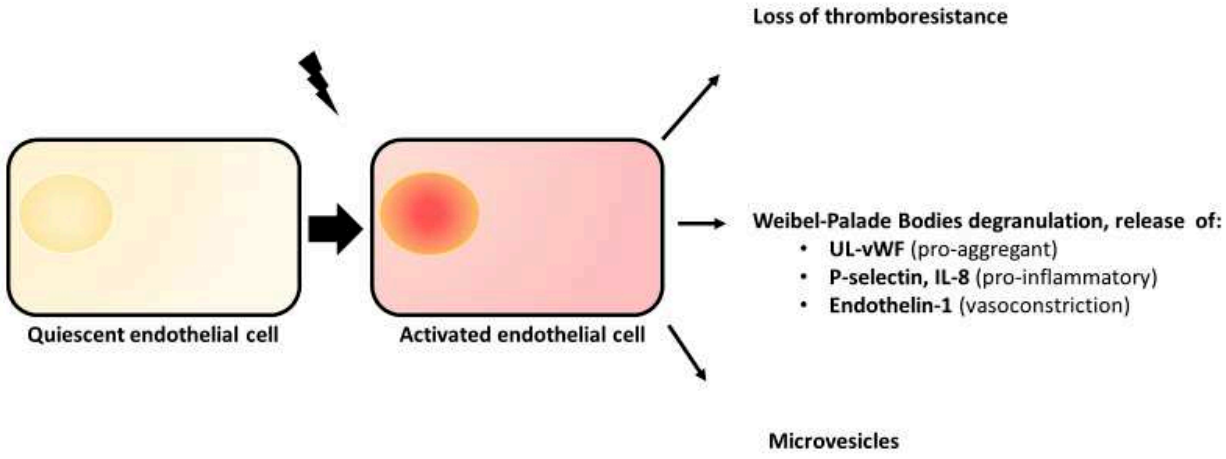


Figure 1. Consequences of endothelial cell activation. UL-VWF = Ultralarge von Willebrand factor; IL-8 = Interleukin-8.

Moreover, endothelial activation triggers cell vesiculation [25], leading to endothelial microvesicles (EMVs) generation and release in blood flow. These extracellular vesicles have a size ranging from 0.1 to 1 µm. EMV possess an essential role in intercellular communication. Their biogenesis occurs via the plasma membrane blebbing of ECs with whom they share common characteristic phenotypic features. EMVs have procoagulant properties because of the phosphatidylserine and TF, but they also seem to be involved in fibrinolysis with uPA or tPA [26]. They are generally pro-inflammatory and partly responsible for the dysregulation of vascular tone in endothelial dysfunction. Thus, EMVs, considered only as biomarkers for a long time, are likely to be also biologic effectors that actively participate to the endothelial activation consequences.

As pointed out by Roumenina et al. [27], ECs constitute all together a source, a barrier in well-regulated conditions and a target in pathologic conditions, for hemostasis and complement system actors. They form a "quiescent endothelium" different of the "activated endothelium" under regulated activation or in response to various stimuli. This activated endothelium can also lead to the "saturated endothelium" when ECs regulation capacity are exceeded. Then, two situations can occur: (1) the endothelial activation is too intense and it exceeds cells physiologic regulation potential (e.g., during septic shock) or (2) an acquired or innate susceptibility (e.g., ADAMTS13 deficiency) leads to disastrous repercussions: ECs are then the main target and actor of amplification loops.

A key point is that endothelial activation is a dynamic continuum between a quiescent and an activated phenotype. There is also a spatial heterogeneity of phenotypic features

that would help us to distinguish between these two phenotypes [28] and a modulation of cytokines effects on ECs depending on the vascular site.

Finally, two types of endothelial activation have been usually described based on inflammatory context [29]. ECs type 1 activation typically occurs within few minutes. It does not involve gene expression modulation and is mediated by G-protein-coupled-receptors (GPCRs) leading to an intracellular calcium (Ca^{2+}) influx. ECs type 2 activation is mediated by a more sustained signal. It involves gene expression regulation. Tumor-Necrosis Factor (TNFα) and Interleukin-1 are the main mediators of this response. These signaling leads to the nuclear translocation of the transcription factor NFκB and AP-1, resulting in cytokine and chemokine production. Nevertheless, those two types of activation are mutually dependent and many crosstalk exist.

2.3. Weibel–Palade Bodies

Weibel–Palade Bodies (WPBs) are endothelial-specific storage organelles and their composition is closely linked to the physiological regulatory functions of the endothelium [30]. These cigar-shaped granules come from the Golgi apparatus. Their biogenesis is complex and is not fully understood but seems to depend on VWF multimerization process [31]. WPBs contain UL-VWF, which has a major role in hemostatic function. They also contain P-selectin, an important leukocyte adhesion molecule, Interleukin-8 (cytokine), eotaxtin-3 (chemokine), Endothelin-1 (vasoconstrictor) and Angiopoietin-2 involved in angiogenesis. Other molecules have been identified in CWP, such as the Complement Factor H, Osteoprotegerin, t-PA, etc. However, this list is not exhaustive because of the spatial and temporal WPB heterogeneity similar to the ECs heterogeneity previously described [30–32].

The endothelial activation leads to WPBs fusion with the apical plasma membrane and the subsequent release of their content in the blood circulation. Two different pathways of WPB agonists-induced degranulation are described [32]:

- The Ca^{2+}-mediated pathway: agonists, such as thrombin and histamine activate G_qPCRs and G_iPCRs, leading to the activation of phospholipase Cβ and the formation of inositol triphosphate (IP3). The fixation of IP3 on the endoplasmic reticulum membrane IP-3 receptor generates a Ca^{2+} intracellular influx which triggers the degranulation of the cortical pool of WPBs. It also increases vascular permeability involving VE-Cadherin phosphorylation and myosin light-chain phosphorylation and participates in the vesiculation process [33].
- The cAMP-mediated pathway (cyclic adenosine monophosphate): other agonists, such as epinephrine and serotonin activate G_sPCRs, inducing an increase in cAMP intracellular level. This results in the activation of the PKA (protein kinase A) that triggers a lower degranulation of WPB microtubular pool. In contrast to the Ca^{2+}-mediated pathway, cAMP-mediated pathway is associated with a decrease in vascular permeability.

2.4. From Endothelial Activation to Endothelial Dysfunction

The endothelial activation is a well-regulated physiological stress-response. Nevertheless, it may have adverse impacts when it becomes chronic or uncontrolled. Indeed, the chronic EC activation leads to endothelial dysfunction affecting vascular tone, hemostasis, and inflammation. The term of endothelial dysfunction was initially used in the context of atherosclerosis [34,35], to describe the impaired NO-dependent vasodilatation to various biomechanical or chemical stimuli, such as an increase in blood flow or acetylcholine. However, a chronic EC activation also leads to an impaired regulation of other functions, resulting in a prothrombotic and pro-inflammatory phenotype. Chronic endothelial dysfunction involves a reduction in NO bioavailability and an oxidative stress which takes part in eNOS (endothelial NO-synthase) uncoupling. Disturbed flow can actively participate in endothelial dysfunction, inducing epigenetic modification in ECs [36,37]. Endothelial dysfunction is also associated with a greater endothelial senescence and apoptosis and it is a marker, and, most probably, also an actor of the global cardiovascular risk.

3. Evidence for Endothelial Activation in TTP

One of the key features of TTP pathogenesis is UL-VWF accumulation. The endothelial activation leads to UL-VWF massive release through CWPs degranulation. This phenomenon is supposed to be the trigger for TTP crisis when occurring in an ADAMTS13 deficiency context. In this part, we discuss clinical and experimental data that support or contradict this hypothesis.

3.1. Clinical Points

Patients with not treated hereditary TTP have a null or very low ADAMTS13 activity from birth. However, the first TTP crisis can occur at adulthood, especially during pregnancy [8,38,39]. Similarly, patients with i-TTP may have a very low ADAMTS13 activity (<5%) without displaying biological or clinical features of TMA [40,41]. These data suggest that ADAMTS13 deficiency is a necessary but not sufficient condition to induce TTP. Furthermore, an infectious episode is frequently reported few weeks before the crisis supporting the hypothesis of an environmental triggering factor.

3.2. Endothelial Exploration in Humans in TTP

Measurements of ECs activation degrees are possible by various in vitro studies, such as morphologic analysis, phenotypic markers analysis or functional tests. However, in clinical practice, evaluation of ECs activation degree is not easy. Nevertheless, some investigative methods exist soluble and cellular biomarkers analysis and histological studies.

Biomarkers analysis is a systemic approach of endothelial activation in clinical practice [42–44]. Classically plasmatic biomarkers analyzed are hemostatic biomarkers (soluble TM, soluble TF, VWF, t-PA and PAI-1), cytokines and soluble forms of adhesion proteins, such as VCAM, ICAM, E-selectin and P-selectin. High levels of soluble biomarkers of endothelial injury during the acute phase of TTP has been highlighted for a long time. Takahashi et al. reported in 1991 that plasmatic TM concentration was higher in TTP patients compared to healthy subjects, and decreased during remission [45]. Moreover, Mori et al. reported that plasmatic TM was associated with mortality in TTP patients, suggesting that TM plasmatic level could constitute a prognosis factor [46]. Soluble P-selectin [47,48], soluble t-PA [49], soluble PAI-1 and VWF:Ag (VWF antigen) have been proposed as EC activation markers in TTP patients plasma. Soluble P-selectin is also correlated to usual markers of TTP activity (platelet and LDH levels) [50]. Some authors support that endothelial activation leads to a procoagulant state [51] without high fibrinolysis level [52]. This idea is based on hemostatic parameters, such as sTFPI/sTF ratio, t-PA and PAI-1 analysis, although t-PA data differ between studies [49,52]. These parameters seem today obsolete in TTP context and their relevance questionable. Indeed, platelet-rich and fibrin-poor thrombi are the hallmark of the disease [53], suggesting a modest involvement of the coagulation system in TTP. Some data suggest that fibrinolytic system induced by ECs hypoxia may be a bypass pathway for VWF multimers cleavage [54]. Then, an alteration of ECs fibrinolytic potential has been proposed as a critical event for TTP crisis [55]. Van Mourik et al. proposed to analyze the VWF:Ag/VWF-propeptide ratio to distinguish between an acute or a chronic endothelial activation [56]. Indeed, the secretions of VWF:Ag and its propeptide are equimolar but their half-life are different: the propeptide is cleared from the circulation five times faster than the VWF:Ag. However, this ratio may be difficult to interpret in the TTP context: the ADAMTS13 deficiency modifies the half-life of VWF and the TPE provides de novo ADAMTS13. Furthermore, the dynamics for reconstitution of WPBs is not fully understood and a high level of circulating UL-VWF is not associated with TTP crisis [57]. The clinical relevance of these parameters is nowadays questionable [43].

Cellular biomarkers have been developed more recently. As mentioned, ECs activation and dysfunction are associated with EMVs production, but also with the detachment of ECs from the basal membrane. This results in generation of circulating endothelial cells (CEC). EMVs and CECs levels, which reflect endothelial injury, have been associated with an increase in global cardiovascular risk and may be poor prognosis factors for many

diseases [25,44]. In addition to being biomarkers, they probably actively participate in vascular damage through vectorization of deleterious signals. Jimenez et al. were the first to document EMVs in TTP. They demonstrated that TTP plasmas induced a procoagulant EMVs generation from cultured brain and renal microvascular ECs (MVECs) [58]. They also shown elevated concentrations of EMVs in TTP patients during acute phase normalized during remission [59], shortly before LDH and platelet normalization. On the other hand, CEC were identified in 1993 in a TTP patient [60] and this was confirmed by Widemann et al. in a prospective multicentric study on 22 patients: CECs were elevated during acute phase of the TTP and normalized during remission and high CEC level at diagnosis was associated with clinical severity [50].

Biopsies with morphologic analysis and immuno-histological investigations of endothelium are rarely practiced. The procedure is invasive, and the subsequent analysis remains focal. However, histological features of endothelial lesions are frequently observed in other thrombotic microangiopathies, especially on renal biopsy. Above-mentioned data support that endothelial activation occurs in TTP and may be a prognosis factor. However, it remains to determine if ECs activation is a cause or a consequence of thrombi formation. Dang et al. provide responses elements [61]: they analyzed 8 spleens from TTP patients and highlighted thrombi and EC apoptosis overexpressed Fas as compared to control spleens. Interestingly, many apoptotic cells did not colocalize with thrombi, suggesting that ECs apoptosis precedes thrombi formation. However, as noticed by Jimenez [62], a percentage of ECs apoptosis should be interpreted with analysis of EC activation degree as Fas is also an ECs activation marker through NFκB pathway.

3.3. In Vitro Experimental Data

In 1982, Burns et al. reported that serum from TTP patients induced endothelial lesions in vitro as compared to serum from healthy volunteers [63]. They highlighted a pathogenic effect of the IgG fraction that fixed HUVECs (Human Umbilical Vein ECs) and induced ultrastructural lesions. Many other studies subsequently demonstrated a pathogenic effect of TTP plasmas on ECs. Laurence et al. reported the pro-apoptotic effect of 4 TTP plasmas on microvascular ECs, but not on macrovascular ECs. One of which was associated with HIV infection. This was not observed with plasmas from patients with disseminated intravascular coagulation or from asymptomatic HIV patients [64]. This pro-apoptotic effect seemed to be Fas-mediated and independent from TNFα or CD36 pathway. Mitra et al. then showed that this pro-apoptotic effect was induced with plasma from acute TTP patients, but not with plasma from patients in remission and only in restricted lineage of microvascular ECs [65]. Thus, Human Microvascular Endothelial Cells (HMVECs) from hepatic and pulmonary lineage were not affected, liver and lung being interestingly generally spared during TTP crisis. Jimenez et al. highlighted a mainly activator effect of TTP plasma on HMVECs, without a clear pro-apoptotic effect, based on phenotypic features of EMVs generated [59]. They also showed that EMVs generated in vitro carried VWF and induced platelet aggregation [66]. Discordances between these studies may be at least partly explained by the use of different experimental methods [62,67]. Finally, our team recently showed that plasmas from acute TTP patients induced a calcium and IgG WPB degranulation in vitro with a strong correlation with the pathology severity [68].

3.4. In Vivo Experimental Data

Motto et al. were the first to generate a TTP mice model, knocking-out ADAMTS13 gene on a mixed strain C57BL6/J–128X1/SvJ background [69]. Despite the loose of ADAMTS13 activity, mice did not present any clinical or biological TMA feature. These results were confirmed by Banno et al. [70]. Then, the mice were backcrossed on the CASA/Rk background which confers higher VWF levels. Consequently, a prothrombotic state was observed, with mild thrombocytopenia and a survey slightly decreased. TTP was finally induced through intravenous Shigatoxin administration. Shigatoxin is a bacterial toxin mainly produced by certain strains of Escherichia Coli and responsible for typical

Hemolytic and Uremic Syndrome (HUS), another TMA that principally affects the kidney. Shigatoxin exists on two isoforms and is composed of two subunits: the A-subunit induces a ribotoxic stress leading to EC death and the B-subunit induces the WPBs degranulation. This B-subunit is sufficient alone to induce TTP in this model [71]. Interestingly, double knock-out mice for ADAMTS13 and for VWF were protected from shigatoxin deleterious action [72], confirming that UL-VWF release is a key point of pathophysiology of TTP.

Feys et al. developed a TTP baboon model [73]. Authors generated murine blocking monoclonal antibodies (mAb) against human recombinant ADAMTS13. They injected this mAb to 6 healthy baboons. ADAMTS13 activity was lost and biological and histological features of TTP present, without clinical repercussion. Authors concluded that, contrary to observations in the mice model, an additional trigger was not necessary to induce TTP in baboons. The differences observed between the mice and the baboon models could be related to supplying protease in mice, such as plasmin, enough in case of isolated ADAMTS13 deficiency, but exceeded in case of massive endothelial activation. Nevertheless, ECs activation was not assessed in the baboon model and a direct effect of anti-ADAMTS13 antibodies on endothelial cells could not be excluded [74].

Le Besnerais et al. examined endothelial injury in another model of TTP, in which PTT was induced with administration of recombinant VWF, including UL-VWF, in ADAMTS13-deficient mice [74]. A systolic dysfunction was highlighted with a decrease in myocardial perfusion on magnetic resonance imaging, associated with an alteration of NO-mediated relaxation response in coronary and mesenteric arteries. These results reflected early endothelial dysfunction. Cardiac ECs presented a globally proadhesive state with overexpression of VCAM and E-Selectin and a pro-oxidative state.

Recently, Zheng et al. generated ADAMTS13 −/− zebrafish which exhibited spontaneously a mild thrombocytopenia with increased fragmentation of red blood cells and presented a prothrombotic state [75]. TTP was induced through a Lysine-rich histones injection, known to be WPBs calcium-dependent degranulation inducers [76]. Thrombocytopenia was more severe and microvascular VWF-rich microthrombi in the ADAMTS13 −/− zebrafish group more present compared to the wild type group. However, the Kaplan-Meyer survival analysis indicated a 2 week mortality rate after the histone challenge around 25% in the ADAMTS13 −/− group, which corresponds to a TTP model much less severe than in humans. The prothrombotic features (spontaneous or histones induced) of ADAMTS13 −/− zebrafish were—as expected—completely rescued in case of double knock out ADAMTS13 −/− and VWF −/−.

Other TTP rodent models have been developed, especially some auto-immune models [77–79]. In all of those, TTP induction needed recombinant VWF or Shigatoxin administration.

4. What Are the Suspected Triggers for the Second Hit Hypothesis?

Pregnancy is a common trigger of TTP crisis [80,81]. As mentioned above, patients with congenital ADAMTS13 deficiency may be asymptomatic and, thus, undiagnosed for decades until a first TTP crisis. Pregnancy is associated with an ad hoc prothrombotic state, linked to an increase in coagulation factors, circulating VWF levels and a concomitant low decrease in ADAMTS13 activity [82–84]. These additional variations may precipitate the TTP crisis.

Infections have often been suspected to be EC activation triggers in TMA disorders. Indeed, a flu-like episode is frequently reported during prodromes. In the literature, many cases reported TTP crisis occurring subsequently to infections, especially viral [85,86]. A prospective study conducted by the French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies highlighted an infectious event within 2 weeks before the diagnosis in 41% of the 280 patients [87]. Different mechanisms may establish the link between the infectious process and TTP crisis:

– Some viruses, such as the Cytomegalovirus (CMV), have a tropism for ECs and can directly activate them [88].

- The cytokines secreted in response to the infectious process, especially γ-interferon, TNFα and Interleukin-8, may act as CWP degranulation inductors [89]. Type 1 interferons (α and β) may induce TMA, as shown in a murine model [90]. Furthermore, γ-interferon and TNFα are cytokines that downregulate *Adamts13* gene expression in the liver [91].
- TLR-9 (Toll-like receptor-9) is a molecule belonging to innate immunity expressed on neutrophils and ECs which recognizes DNA present in bacteria and viruses. TLR-9 polymorphisms have been suspected to be a genetic risk factor of TTP crisis [87].

In addition, HIV can lead to two distinct TMA [92]. HIV infection at the AIDS stage may induce a non-specific TMA with ADAMTS13 activity > 5%. This TMA has a very poor prognosis and may be mediated by angio-invasive infections in the context of major immunosuppression. However, HIV can also lead to i-TTP, with a better prognosis. Presence of p24 antigen in ECs from bone marrow has been reported in one patient [93], but this case seems isolated and pathogenesis of HIV-induced i-TTP is globally unknown.

Finally, many cases of TTP following COVID-19 have been reported [94]. SARS-CoV-2 is now well known as an endothelial activator [95] and may therefore precipitate TTP in susceptible individuals. ACE2, the main receptor of SARS-CoV-2, has been identified on endothelial cells, but other receptors also seem involved in viral entry (neuropilin 1, CD147) [96]. Viral entry in endothelial cells would even not be necessary, indeed Lei et al. described that proteins S and N would be sufficient to cause endothelial dysfunction [97]. Furthermore, endothelial damages in COVID-19 are also secondary to infection of neighboring cells and of hyper-inflammatory syndrome [98].

Many drugs have been incriminated for the development of TMA, such as calcineurin inhibitors, mitomycin, gemcitabine, anti-VEGF agents and quinine [8]. Generally, these drug-induced TMA are not associated with a profound ADAMTS13 activity deficiency. Many mechanisms are suspected and they overall involve ECs aggression, inducing an activated phenotype of ECs. For example, calcineurin inhibitors induce a prothrombotic and proinflammatory state with a decrease in NO and PGI2 production and an increase in endothelin-1 and thromboxane A2 synthesis [19]. Ticlopidine (a thienopyridine platelet-antagonist) seems to be an exception, as it induces TTP within 2 to 12 weeks after introduction of the drug [99]. Today, pathogenesis of this induced auto-immunity is very uncertain. Interestingly, Mauro et al. showed that pharmacological doses of ticlopidine induced in vitro EC apoptosis with the same restricted lineage affected as discussed above: macrovascular ECs and hepatic and pulmonary microvascular ECs were spared from this pro-apoptotic response. This study relied ticlopidine induced in vitro EC apoptosis to an alteration of ECs interaction with subendothelial matrix [100].

As previously mentioned, IgG fraction has been incriminated for long to explain endothelial aggression occurring in TTP. The mechanisms involved in auto-immunity in TTP remains unknown. The loss of tolerance to ADAMTS13 may be linked to a genetic predisposition involving the major histocompatibility complex class II (HLA DRB1*04 as protective and HLA DRB1*11 and DQB1*03 as predisposing) [101,102]. Interestingly, peptides from CUB2 domain of ADAMTS13 were presented on HLA DRB1*11 [103] and there is some evidence of involvement of CUB2 domain-reactive CD4+ T Cells in i-TTP [104]. Many studies highlighted the presence of antibodies against ECs (AECA) in plasmas of TTP patients. These antibodies have the property to induce CWP degranulation in vitro [105]. Even if the targeted epitope is not always known, two studies reported a significant proportion of TTP patients with anti-CD36 antibodies [106,107]. CD36 is an antigen present on microvascular ECs but not on macrovascular ECs. In 2000, Praprotnik et al. proposed a pathophysiology including two auto-immune hits: AECA would activate microvascular ECs, inducing a massive UL-VWF release, that, therefore, accumulate into microcirculation because of the immune-mediated ADAMTS13 deficiency [105]. Nevertheless, the proportion of patients with AECA is a controversial issue and a significant part of these antibodies are thought to target the major histocompatibility complex (MHC) [108]. Indeed, in allogeneic kidney transplantation, donor specific antibodies may induce ECs aggression, leading to acute

or chronic humoral graft rejection with TMA histologic features [109]. Moreover, Ren et al. showed that administration of xenogeneic AECA to rats led to dose-dependent and complement-mediated TMA features [110]. We also demonstrated a potential role of ADAMTS13 antibodies: anti-ADAMTS13 monoclonal antibodies purified from iTTP patients B cells induced an ECs activation calcium dependent leading to a degranulation of WPBs [68].

Surgery or endovascular procedures have been described as trigger of TTP [111]. Endothelial activators (alpha-thrombin, nucleosomes, reactive oxygen species, etc.) generation during ischemia-reperfusion could lead to endothelial cell activation with vWF release [112].

Recently, TMA were observed after a snake bite in Sri Lanka, especially by *Hypnale hypnale*, as known as the hump-nosed viper [113]. Venom analysis highlights the presence of phospholipase A2, serine-proteases, metalloproteinases and of thrombin-like enzyme [114,115]. Effects of these venoms on ECs may be an interesting track to explore.

5. Amplification Loops of Endothelial Aggression

TTP is characterized by ADAMTS13 deficiency and the accumulation of UL-VWF following endothelial activation. This leads to the involvement of other actors that maintain and aggravate endothelial damage leading to a "saturated endothelium" stage. These amplification loops involve the alternative complement pathway, hemolysis and nucleosomes and are shown in Figure 2.

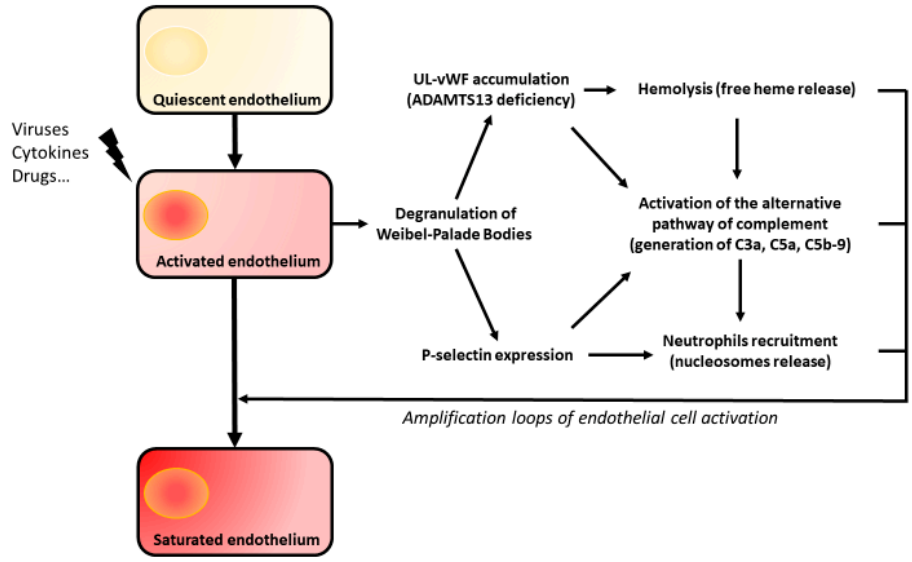


Figure 2. During PTT crisis, endothelium is the target of amplifications loops involving hemolysis, complement system and nucleosome UL-vWF = Ultralarge von Willebrand factor.

5.1. The Complement System

The complement system is an archaic defense system belonging to innate immunity. It is composed of a large number of proteins acting through a highly regulated cascade activation [116]. Complement activation leads to three main consequences: (i) pathogen agents' lysis through the action of C5b9, the membrane attack complex; (ii) apoptotic cells clearance through opsonization by C3b; and (iii) amplification of inflammatory response, through the action of C3a and C5a anaphylatoxins. The activation cascade can be initiated through a classical, lectin or alternative pathway. These pathways converge in a common terminal effector, the C5b9. The alternative pathway of the complement (APC) is characterized by a permanent low activation degree through spontaneous C3 hydrolysis. It needs to be regulated by soluble inhibitors, such as complement factor H and factor I, respectively, CFH and CFI and membranous inhibitors, such as Membranous Cofactor.

The complement system is involved in many thrombotic microangiopathies. Atypical HUS is a TMA affecting mainly kidneys and is a well-known "complementopathy" model [117]. Up to 60% of patients have an identified anomaly affecting APC: mutations leading to a loss of function affecting regulators (CFH, CFI, MCP and others) or an inhibitory antibody against CFH; mutations leading to a gain of function affecting activators C3 and Complement Factor B (CFB). This dysregulated activation of APC leads to ECs aggression, especially in the presence of an additional trigger, such as glycocalyx alteration or free heme release. This induces a strongly pro-thrombotic and pro-inflammatory endothelial phenotype with microthrombi formation, especially in glomerular endothelium. Eculizumab is a monoclonal antibody against the C5 fraction of complement targeting the common terminal pathway. It has dramatically improved outcomes of complement-mediated HUS. Other data support the complement involvement in pathogenesis of typical HUS [118,119], preeclampsia [120] and allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (HSCT) [121–123] related TMA. Thus, complement involvement in TTP pathogenesis has been supposed.

Many studies highlighted complement activation in TTP by indirect signs. C3a, C5a and soluble C5b9 are markedly elevated during acute phase and normalized during remission [124,125]. High levels of these markers are associated with poor outcome [126]. In accordance with these data, therapeutic plasma exchanges strongly decrease these markers even if their level are probably lower than in atypical HUS [127]. Only the APC seems to be involved in TTP. Indeed, Tati et al. have identified C3 and C5b9 in renal cortex of TTP patients and have highlighted that TTP plasma induced release of C3- and C9-coated EMVs in vitro [128]. Furthermore, Mikes et al. report a statistic correlation between the alternative pathway C3 convertase and endothelial degranulation, which was measured by carboxyterminal pro-endothelin-1 [129]. However, a causal link between APC activation and endothelial degranulation could not be establish because of the multitude of confounding factors, i.e., factors causally linked to APC and to ECs.

Moreover, UL-VWF is a platform for activation of the alternative pathway of complement. Tati et al. showed that administration of Shigatoxin to mice led to glomerular damage and C3 deposit only if mice were KO ADAMTS13 −/− [128]. Bettoni et al. showed that plasmas from hereditary TTP patients in acute phase induced C3 and C5b9 but not C4 deposits on HMVECs with comparable intensity of induced atypical HUS plasma deposits [125]. Remarkably, there were no more complement deposit with the adjunction of recombinant ADAMTS13. Yet, ADAMTS13 had no intrinsic inhibitory action on the alternative pathway C3 convertase formation. Turner et al. highlighted colocalization between APC components, especially C3, and UL-VWF. Thereafter, Bettoni et al. demonstrated a direct interaction between C3b and the A2 domain of VWF, leading to AP-C3/C5 convertase and C5b9 formation [125,130]. They also showed in vitro that the thrombus formation induced by TTP plasmas was corrected by restoring ADAMTS13 activity but also by complement inhibition. UL-VWF lose the ability of "normal" VWF multimers to act as cofactor of CFI, therefore losing the role of APC regulator [131]. Bettoni et al. proposed a mechanistic overview: during TTP crisis, UL-VWF pile up on the endothelial cell surface and act as platform for activation of the APC, leading to C5a and C5b9 formation that induce WPB degranulation resulting in an amplification loop. Furthermore, C5a induces shedding of TM, which downregulates coagulation cascade and indirectly inactivates C3b, as a cofactor of CFH and CFI, C3a and C5a, as a cofactor of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor [27].

Recently, Zheng et al. demonstrated in a mice model that ADAMTS13 genetic deficiency had synergistic effect with APC over-activation resulting from heterozygous mutation of CFH, leading to severe TMA. Each of these genetic defects were asymptomatic when isolated [132].

P-selectin is another compound of WPBs and is expressed on activated ECs. It is a platelet and leukocyte adhesion molecule and may also serve as a platform for APC activation [133]. Thus, P-selectin may act as an amplification loop through different ways.

P-selectin interacts with C3b [27,134], leading to the formation of C3a, C5a and C5b9 and the endothelial activation [135,136]. Furthermore, P-selectin participates to neutrophils recruitment, which are more cytotoxic during TTP crisis and seem to induce a complement-dependent loss of thromboresistance in vitro [137]. Finally, P-selectin is also expressed on activated platelets, which may also act as a platform for APC activation [138].

Nevertheless, Eculizumab has exceptionally been used in TTP. One case reported a very rare overlap syndrome: the patient had auto-antibodies against ADAMTS13 and against CFH [139,140]; one case was a hereditary TTP [141]; two recent cases were i-TTP with heterozygous variants of CFH, CFI and C3 [142]. These few observations do not allow us to conclude on the interest of Eculizumab in TTP.

5.2. Hemolysis

Intravascular hemolysis has been for long suspected to act as an amplification loop of ECs activation in TMA. Hemoglobin released induces NO consumption and produces reactive oxygen species [143], leading to endothelial dysfunction and CWP degranulation [144,145]. Hemoglobin also participates to decrease ADAMTS13 activity [146]. Furthermore, free heme has been suspected to be a critical event leading to atypical HUS when occurring on a deleterious underlying condition. Free heme induces (i) WPB degranulation in a TLR4-dependant manner [147], (ii) APC activation on ECs and (iii) APC activation in the fluid phase through facilitation of C3-C3 homophilic interaction [148,149]. We have recently shown high levels of plasmatic free heme in TTP patients. Furthermore, ECs treatment with hemopexin mildly decreased calcium influx and WPB degranulation in vitro, which supports a modest amplification role of free heme [68].

5.3. Nucleosomes

In response to inflammatory or infectious stimuli, neutrophils can release Neutrophils Extracellular Traps (NETs), composed of nucleosomes (DNA and histone) and of proteins, such as myeloperoxidase (MPO), neutrophil-elastase and cathepsin G. NETs have anti-infectious properties as they are "trapping" bacteria [150]. However, they also seem to have prothrombotic properties [151]. Furthermore, histones can induce consumptive thrombocytopenia in mice [152]. In 2012, Fuchs et al. showed that in patient with TMA disorders, high levels of circulating DNA and MPO were associated with low platelet counts and a low ADAMTS13 activity. These markers normalized during remission [153]. Moreover, nucleosomes are incriminated for endothelial activation in typical HUS and in allogeneic HSCT related TMA [154,155]. In this context, interleukin-8 released from endothelium may induce NETs production, which act as platform for APC [156]. As discussed above, Lysine-rich histones are used to trigger TTP in a zebrafish model. This suggests a potent mechanistic link between inflammation and TTP crisis. Moreover, Michels et al. have shown that Lysine-rich histones may act as WPB degranulation inducers by a Ca^{2+}-, caspase- and charge-dependent mechanism [76]. Furthermore, ischemic damages can also lead to DNA and histones release [157], therefore acting as another prothrombotic amplification loop. Our team recently confirmed high levels of nucleosomes in plasma from acute TTP patients and a participation of these nucleosomes in iTTP patient's plasma ECs activation [68].

6. Conclusions

Currently, we admit that chronic endothelial activation leads to major endothelium dysfunctions implying deregulation of hemostasis, inflammation and vascular tone. Similarly, in some circumstances, such as TMA, an acute endothelial activation can also have deleterious consequences. However, in some circumstances, such as TMA, an acute endothelial activation can also lead to deleterious consequences. We suggest that in TTP, endogenous factors, such as antibodies, cytokines, heme, histones or exogenous factors, such as virus, drug or toxin, induce an endothelial activation affecting mainly microvascular cells. This leads to a Ca^{2+}-dependent WPB degranulation, resulting in UL-VWF accumula-

tion in the microcirculation. These events may be cumulative and may be associated with amplification loops, to reach an activation level such as balance is disrupted and TMA occurs. P-selectin expression is a consequence of ECs activation, and may be a key point of pathogenesis because UL-VWF are thought to be anchored on ECs through it [158]. EMVs may also participate of amplification and systematization of the TMA process.

Despite recent therapeutic advances, mortality and morbidity during TTP remain major concerns. We have exposed clinical and experimental data supporting the "second hit hypothesis". Furthermore, endothelium is strategically located between blood and tissues and, therefore, preferentially accessible to drugs. Its plasticity may be an interesting feature for pharmacological modulation, making endothelial cells an attractive therapeutic target [159]. Thus, we think that there is a rational basis to pharmacologically inhibit endothelial cell activation. This would be a new therapeutic axis.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. George, J.N.; Nester, C.M. Syndromes of Thrombotic Microangiopathy. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 654–666. [CrossRef] [PubMed]
2. Moake, J.L.; Rudy, C.K.; Troll, J.H.; Weinstein, M.J.; Colannino, N.M.; Azocar, J.; Seder, R.H.; Hong, S.L.; Deykin, D. Unusually Large Plasma Factor VIII: Von Willebrand Factor Multimers in Chronic Relapsing Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N. Engl. J. Med.* **1982**, *307*, 1432–1435. [CrossRef] [PubMed]
3. Fujikawa, K.; Suzuki, H.; McMullen, B.; Chung, D. Purification of human von Willebrand factor–cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* **2001**, *98*, 1662–1666. [CrossRef] [PubMed]
4. Zheng, X.; Chung, D.; Takayama, T.K.; Majerus, E.M.; Sadler, J.E.; Fujikawa, K. Structure of von Willebrand Factor-cleaving Protease (ADAMTS13), a Metalloprotease Involved in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41059–41063. [CrossRef] [PubMed]
5. Lotta, L.A.; Garagiola, I.; Palla, R.; Cairo, A.; Peyvandi, F. ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, 11–19. [CrossRef] [PubMed]
6. Tsai, H.-M.; Lian, E.C.-Y. Antibodies to von Willebrand Factor–Cleaving Protease in Acute Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 1585–1594. [CrossRef] [PubMed]
7. Scully, M.; Yarranton, H.; Liesner, R.; Cavenagh, J.; Hunt, B.; Benjamin, S.; Bevan, D.; Mackie, I.; Machin, S. Regional UK TTP Registry: Correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features. *Br. J. Haematol.* **2008**, *142*, 819–826. [CrossRef]
8. Kremer Hovinga, J.A.; Coppo, P.; Lämmle, B.; Moake, J.L.; Miyata, T.; Vanhoorelbeke, K. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*, 17020. [CrossRef]
9. Reeves, H.M.; Maitta, R.W. Comparison of absolute immature platelet count to the PLASMIC score at presentation in predicting ADAMTS13 deficiency in suspected thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Res.* **2022**, *215*, 30–36. [CrossRef]
10. Zhu, M.-L.; Reeves, H.M.; Maitta, R.W. Immature platelet dynamics correlate with ADAMTS13 deficiency and predict therapy response in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Res.* **2021**, *198*, 72–78. [CrossRef]
11. George, J.N. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010. *Blood* **2010**, *116*, 4060–4069. [CrossRef] [PubMed]
12. Coppo, P. Treatment of autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura in the more severe forms. *Transfus. Apher. Sci.* **2017**, *56*, 52–56. [CrossRef] [PubMed]
13. Peyvandi, F.; Scully, M.; Kremer Hovinga, J.A.; Cataland, S.; Knöbl, P.; Wu, H.; Artoni, A.; Westwood, J.-P.; Mansouri Taleghani, M.; Jilma, B.; et al. Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 511–522. [CrossRef] [PubMed]
14. Scully, M.; Cataland, S.R.; Peyvandi, F.; Coppo, P.; Knöbl, P.; Kremer Hovinga, J.A.; Zeldin, R.K. Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 335–346. [CrossRef] [PubMed]
15. Poullin, P.; Bornet, C.; Veyradier, A.; Coppo, P. Caplacizumab to treat immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Drugs Today* **2019**, *55*, 367–376. [CrossRef] [PubMed]
16. Deford, C.C.; Reese, J.A.; Schwartz, L.H.; Perdue, J.J.; Kremer Hovinga, J.A.; Lämmle, B.; George, J.N. Multiple major morbidities and increased mortality during long-term follow-up after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **2013**, *122*, 2023–2029. [CrossRef]

17. Kremer Hovinga, J.A.; Vesely, S.K.; Terrell, D.R.; Lämmle, B.; George, J.N. Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **2010**, *115*, 1500–1511. [CrossRef] [PubMed]
18. Ruggenenti, P.; Noris, M.; Remuzzi, G. Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int.* **2001**, *60*, 831–846. [CrossRef] [PubMed]
19. Goldberg, R.J.; Nakagawa, T.; Johnson, R.J.; Thurman, J.M. The Role of Endothelial Cell Injury in Thrombotic Microangiopathy. *Am. J. Kidney Dis.* **2010**, *56*, 1168–1174. [CrossRef]
20. Tsai, H.M. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and the Hemolytic-Uremic Syndrome. In *Platelets*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp. 883–907. Available online: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123878373000432 (accessed on 2 August 2019).
21. Jaffe, E.A. Cell biology of endothelial cells. *Hum. Pathol.* **1987**, *18*, 234–239. [CrossRef] [PubMed]
22. Aird, W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 158–173. [CrossRef] [PubMed]
23. Aird, W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 174–190. [CrossRef] [PubMed]
24. Sturtzel, C. Endothelial Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *1003*, 71–91. [PubMed]
25. Sabatier, F.; Camoin-Jau, L.; Anfosso, F.; Sampol, J.; Dignat-George, F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: Key players towards the definition of vascular competence. *J. Cell Mol. Med.* **2009**, *13*, 454–471. [CrossRef] [PubMed]
26. Vallier, L.; Cointe, S.; Lacroix, R.; Bonifay, A.; Judicone, C.; Dignat-George, F.; Kwaan, H.C. Microparticles and Fibrinolysis. *Semin. Thromb. Hemost.* **2017**, *43*, 129–134. [CrossRef] [PubMed]
27. Roumenina, L.T.; Rayes, J.; Frimat, M.; Fremeaux-Bacchi, V. Endothelial cells: Source, barrier, and target of defensive mediators. *Immunol. Rev.* **2016**, *274*, 307–329. [CrossRef] [PubMed]
28. Pober, J.S.; Sessa, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 803–815. [CrossRef]
29. Pober, J.S.; Cotran, R.S. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* **1990**, *50*, 537–544. [CrossRef]
30. Lowenstein, C.J.; Morrell, C.N.; Yamakuchi, M. Regulation of Weibel–Palade Body Exocytosis. *Trends Cardiovasc. Med.* **2005**, *15*, 302–308. [CrossRef]
31. Mourik, M.; Eikenboom, J. Lifecycle of Weibel-Palade bodies. *Hamostaseologie* **2017**, *37*, 13–24. [CrossRef]
32. Rondaij, M.G.; Bierings, R.; Kragt, A.; Van Mourik, J.A.; Voorberg, J. Dynamics and Plasticity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 1002–1007. [CrossRef] [PubMed]
33. Tiruppathi, C.; Minshall, R.D.; Paria, B.C.; Vogel, S.M.; Malik, A.B. Role of Ca^{2+} signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vasc. Pharmacol.* **2002**, *39*, 173–185. [CrossRef] [PubMed]
34. Ludmer, P.L.; Selwyn, A.P.; Shook, T.L.; Wayne, R.R.; Mudge, G.H.; Alexander, R.W.; Ganz, P. Paradoxical Vasoconstriction Induced by Acetylcholine in Atherosclerotic Coronary Arteries. *N. Engl. J. Med.* **1986**, *315*, 1046–1051. [CrossRef] [PubMed]
35. Poredos, P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int. Angiol.* **2002**, *21*, 109–116. [PubMed]
36. Endemann, D.H.; Schiffrin, E.L. Endothelial dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 1983–1992. [CrossRef]
37. Huynh, D.T.N.; Heo, K.-S. Therapeutic targets for endothelial dysfunction in vascular diseases. *Arch. Pharmacal Res.* **2019**, *42*, 848–861. [CrossRef]
38. Moatti-Cohen, M.; Garrec, C.; Wolf, M.; Boisseau, P.; Galicier, L.; Azoulay, E.; Stepanian, A.; Delmas, Y.; Rondeau, E.; Bezieau, S.; et al. Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **2012**, *119*, 5888–5897. [CrossRef]
39. Mariotte, E.; Azoulay, E.; Galicier, L.; Rondeau, E.; Zouiti, F.; Boisseau, P.; Poullin, P.; de Maistre, E.; Provôt, F.; Delmas, Y.; et al. Epidemiology and pathophysiology of adulthood-onset thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency (thrombotic thrombocytopenic purpura): A cross-sectional analysis of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol.* **2016**, *3*, e237–e245. [CrossRef]
40. Page, E.E.; Hovinga, J.A.K.; Terrell, D.R.; Vesely, S.K.; George, J.N. Clinical importance of ADAMTS13 activity during remission in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **2016**, *128*, 2175–2178. [CrossRef]
41. George, J.N. Measuring ADAMTS13 activity in patients with suspected thrombotic thrombocytopenic purpura: When, how, and why? *Transfusion* **2015**, *55*, 11–13. [CrossRef]
42. Jourde-Chiche, N.; Fakhouri, F.; Dou, L.; Bellien, J.; Burtey, S.; Frimat, M.; Jarrot, P.-A.; Kaplanski, G.; Le Quintrec, M.; Pernin, V.; et al. Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2019**, *15*, 87–108. [CrossRef] [PubMed]
43. Lekakis, J.; Abraham, P.; Balbarini, A.; Blann, A.; Boulanger, C.M.; Cockcroft, J.; Cosentino, F.; Deanfield, J.; Gallino, A.; Ikonomidis, I.; et al. Methods for evaluating endothelial function: A position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **2011**, *18*, 775–789. [CrossRef] [PubMed]
44. Horstman, L.L.; Jy, W.; Jimenez, J.J.; Ahn, Y.S. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front. Biosci.* **2004**, *9*, 1118–1135. [CrossRef] [PubMed]
45. Takahashi, H.; Hanano, M.; Wada, K.; Tatewaki, W.; Niwano, H.; Shibata, A.; Tsubouchi, J.; Nakano, M.; Nakamura, T. Circulating thrombomodulin in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Hematol.* **1991**, *38*, 174–177. [CrossRef]

46. Mori, Y.; Wada, H.; Okugawa, Y.; Tamaki, S.; Nakasaki, T.; Watanabe, R.; Gabazza, E.C.; Nishikawa, M.; Minami, N.; Shiku, H. Increased Plasma Thrombomodulin as a Vascular Endothelial Cell Marker in Patients with Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic Uremic Syndrome. *Clin. Appl. Thromb.* **2001**, *7*, 5–9. [CrossRef]
47. Chong, B.H.; Murray, B.; Berndt, M.C.; Dunlop, L.C.; Brighton, T.; Chesterman, C.N. Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. *Blood* **1994**, *83*, 1535–1541. [CrossRef]
48. Katayama, M.; Handa, M.; Araki, Y.; Ambo, H.; Kawai, Y.; Watanabe, K.; Ikeda, Y. Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome. *Br. J. Haematol.* **1993**, *84*, 702–710. [CrossRef]
49. Wada, H.; Kaneko, T.; Ohiwa, M.; Tanigawa, M.; Hayashi, T.; Tamaki, S.; Minami, N.; Deguchi, K.; Suzuki, K.; Nakano, T.; et al. Increased levels of vascular endothelial cell markers in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Hematol.* **1993**, *44*, 101–105. [CrossRef]
50. Widemann, A.; Pasero, C.; Arnaud, L.; Poullin, P.; Loundou, A.D.; Choukroun, G.; Sanderson, F.; Lacroix, R.; Sabatier, F.; Coppo, P.; et al. Circulating endothelial cells and progenitors as prognostic factors during autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura: Results of a prospective multicenter French study. *J. Thromb. Haemost.* **2014**, *12*, 1601–1609. [CrossRef]
51. Kobayashi, M.; Wada, H.; Wakita, Y.; Shimura, M.; Nakase, T.; Hiyoyama, K.; Nagaya, S.; Minami, N.; Nakano, T.; Shiku, H. Decreased plasma tissue factor pathway inhibitor levels in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Haemost.* **1995**, *73*, 10–14.
52. Glas-Greenwalt, P.; Hall, J.M.; Panke, T.W.; Kant, K.S.; Allen, C.M.; Pollak, V.E. Fibrinolysis in health and disease: Abnormal levels of plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, and protein C in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Lab. Clin. Med.* **1986**, *108*, 415–422. [PubMed]
53. Asada, Y.; Sumiyoshi, A.; Hayashi, T.; Suzumiya, J.; Kaketani, K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb. Res.* **1985**, *38*, 469–479. [CrossRef] [PubMed]
54. Tersteeg, C.; de Maat, S.; De Meyer, S.F.; Smeets, M.W.; Barendrecht, A.D.; Roest, M.; Pasterkamp, G.; Fijnheer, R.; Vanhoorelbeke, K.; de Groot, P.G.; et al. Plasmin Cleavage of von Willebrand Factor as an Emergency Bypass for ADAMTS13 Deficiency in Thrombotic Microangiopathy. *Circulation* **2014**, *129*, 1320–1331. [CrossRef] [PubMed]
55. Lian, E.C.-Y. Pathogenesis of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: ADAMTS13 Deficiency and Beyond. *Semin. Thromb. Hemost.* **2005**, *31*, 625–632. [CrossRef] [PubMed]
56. van Mourik, J.A.; Boertjes, R.; Huisveld, I.A.; Fijnvandraat, K.; Pajkrt, D.; van Genderen, P.J.; Fijnheer, R. von Willebrand factor propeptide in vascular disorders: A tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation. *Blood* **1999**, *94*, 179–185. [CrossRef] [PubMed]
57. Béranger, N.; Benghezal, S.; Savigny, S.; Capdenat, S.; Joly, B.S.; Coppo, P.; Stepanian, A.; Veyradier, A. Loss of von Willebrand factor high-molecular-weight multimers at acute phase is associated with detectable anti-ADAMTS13 IgG and neurological symptoms in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Res.* **2019**, *181*, 29–35. [CrossRef]
58. Jimenez, J.J.; Jy, W.; Mauro, L.M.; Horstman, L.L.; Ahn, Y.S. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: Findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br. J. Haematol.* **2001**, *112*, 81–90. [CrossRef]
59. Jimenez, J.J.; Jy, W.; Mauro, L.M.; Horstman, L.L.; Soderland, C.; Ahn, Y.S. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br. J. Haematol.* **2003**, *123*, 896–902. [CrossRef]
60. Lefevre, P.; George, F.; Durand, J.M.; Sampol, J. Detection of Circulating Endothelial Cells in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Thromb. Haemost.* **1993**, *69*, 522. [CrossRef]
61. Dang, C.T.; Magid, M.S.; Weksler, B.; Chadburn, A.; Laurence, J. Enhanced endothelial cell apoptosis in splenic tissues of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **1999**, *93*, 1264–1270. [CrossRef]
62. Jimenez, J.J.; Jy, W.; Mauro, L.M.; Horstman, L.L.; Soderland, C.; Ahn, Y.S. Response to Laurence. *Br. J. Haematol.* **2004**, *125*, 416–417. [CrossRef]
63. Burns, E.R.; Zucker-Franklin, D. Pathologic effects of plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura on platelets and cultured vascular endothelial cells. *Blood* **1982**, *60*, 1030–1037. [CrossRef] [PubMed]
64. Laurence, J.; Mitra, D.; Steiner, M.; Staiano-Coico, L.; Jaffe, E. Plasma from patients with idiopathic and human immunodeficiency Virus-Associated thrombotic thrombocytopenic purpura induces apoptosis in microvascular endothelial cells. *Transfus. Med. Rev.* **1996**, *10*, 315. [CrossRef]
65. Mitra, D.; Jaffe, E.A.; Weksler, B.; Hajjar, K.A.; Soderland, C.; Laurence, J. Thrombotic thrombocytopenic purpura and sporadic hemolytic-uremic syndrome plasmas induce apoptosis in restricted lineages of human microvascular endothelial cells. *Blood* **1997**, *89*, 1224–1234. [CrossRef]
66. Jy, W.; Jimenez, J.J.; Mauro, L.M.; Horstman, L.L.; Cheng, P.; Ahn, E.R.; Bidot, C.J.; Ahn, Y.S. Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3*, 1301–1308. [CrossRef]
67. Laurence, J. Endothelial cell activation and apoptosis in the thrombotic microangiopathies. *Br. J. Haematol.* **2004**, *125*, 415–416. [CrossRef]

68. Tellier, E.; Widemann, A.; Cauchois, R.; Faccini, J.; Lagarde, M.; Brun, M.; Kaplanski, G. Immune thrombotic thrombocytopenic purpura plasmas induce calcium- and IgG-dependent endothelial activation: Correlations with disease severity. *Haematologica* **2022**. [CrossRef]
69. Motto, D.G.; Chauhan, A.K.; Zhu, G.; Homeister, J.; Lamb, C.B.; Desch, K.C.; Zhang, W.; Tsai, H.-M.; Wagner, D.D.; Ginsburg, D. Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 2752–2761. [CrossRef]
70. Banno, F.; Kokame, K.; Okuda, T.; Honda, S.; Miyata, S.; Kato, H.; Tomiyama, Y.; Miyata, T. Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **2006**, *107*, 3161–3166. [CrossRef]
71. Huang, J.; Motto, D.G.; Bundle, D.R.; Sadler, J.E. Shiga toxin B subunits induce VWF secretion by human endothelial cells and thrombotic microangiopathy in ADAMTS13-deficient mice. *Blood* **2010**, *116*, 3653–3659. [CrossRef]
72. Chauhan, A.K.; Walsh, M.T.; Zhu, G.; Ginsburg, D.; Wagner, D.D.; Motto, D.G. The combined roles of ADAMTS13 and VWF in murine models of TTP, endotoxemia, and thrombosis. *Blood* **2008**, *111*, 3452–3457. [CrossRef] [PubMed]
73. Feys, H.B.; Liu, F.; Dong, N.; Pareyn, I.; Vauterin, S.; Vandeputte, N.; Noppe, W.; Ruan, C.; Deckmyn, H.; Vanhoorelbeke, K. ADAMTS-13 plasma level determination uncovers antigen absence in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura and ethnic differences. *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 955–962. [CrossRef]
74. Le Besnerais, M.; Favre, J.; Denis, C.V.; Mulder, P.; Martinet, J.; Nicol, L.; Benhamou, Y. Assessment of endothelial damage and cardiac injury in a mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* **2016**, *14*, 1917–1930. [CrossRef] [PubMed]
75. Zheng, L.; Abdelgawwad, M.S.; Di Zhang, L.X.; Wei, S.; Cao, W.; Zheng, X.L. Histone-induced thrombotic thrombocytopenic purpura in adamts13-/- zebrafish depends on von Willebrand factor. *Haematologica* **2019**, *105*, 1107. [CrossRef] [PubMed]
76. Michels, A.; Albánez, S.; Mewburn, J.; Nesbitt, K.; Gould, T.J.; Liaw, P.C.; James, P.D.; Swystun, L.L.; Lillicrap, D. Histones link inflammation and thrombosis through the induction of Weibel-Palade body exocytosis. *J. Thromb. Haemost.* **2016**, *14*, 2274–2286. [CrossRef] [PubMed]
77. Tersteeg, C.; Schiviz, A.; De Meyer, S.F.; Plaimauer, B.; Scheiflinger, F.; Rottensteiner, H.; Vanhoorelbeke, K. Potential for Recombinant ADAMTS13 as an Effective Therapy for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 2336–2342. [CrossRef]
78. Deforche, L.; Tersteeg, C.; Roose, E.; Vandenbulcke, A.; Vandeputte, N.; Pareyn, I.; De Cock, E.; Rottensteiner, H.; Deckmyn, H.; De Meyer, S.F.; et al. Generation of Anti-Murine ADAMTS13 Antibodies and Their Application in a Mouse Model for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0160388. [CrossRef]
79. Pickens, B.; Mao, Y.; Li, D.; Siegel, N.L.; Poncz, M.; Cines, U.B.; Zheng, X.L. Platelet-delivered ADAMTS13 inhibits arterial thrombosis and prevents thrombotic thrombocytopenic purpura in murine models. *Blood* **2015**, *125*, 3326–3334. [CrossRef]
80. Fujimura, Y.; Matsumoto, M.; Kokame, K.; Isonishi, A.; Soejima, K.; Akiyama, N.; Tomiyama, J.; Natori, K.; Kuranishi, Y.; Imamura, Y.; et al. Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: A series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br. J. Haematol.* **2009**, *144*, 742–754. [CrossRef]
81. Falter, T.; Hovinga, J.A.K.; Lackner, K.; Füllemann, H.-G.; Lämmle, B.; Scharrer, I. Late onset and pregnancy-induced congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hamostaseologie* **2014**, *34*, 244–248. [CrossRef]
82. Stirling, Y.; Woolf, L.; North, W.R.; Seghatchian, M.J.; Meade, T.W. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb. Haemost.* **1984**, *52*, 176–182. [CrossRef] [PubMed]
83. Furlan, M.; Robles, R.; Galbusera, M.; Remuzzi, G.; Kyrle, P.A.; Brenner, B.; Krause, M.; Scharrer, I.; Aumann, V.; Mittler, U.; et al. von Willebrand Factor–Cleaving Protease in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and the Hemolytic–Uremic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 1578–1584. [CrossRef] [PubMed]
84. George, J.N. The association of pregnancy with thrombotic thrombocytopenic purpura–hemolytic uremic syndrome. *Curr. Opin. Hematol.* **2003**, *10*, 339–344. [CrossRef] [PubMed]
85. Morioka, M.; Matsumoto, M.; Saito, M.; Kokame, K.; Miyata, T.; Fujimura, Y. A first bout of thrombotic thrombocytopenic purpura triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nulliparous female with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood Transfus.* **2014**, *12* (Suppl. 1), s153–s155. [PubMed]
86. Bitzan, M.; Zieg, J. Influenza-associated thrombotic microangiopathies. *Pediatr. Nephrol.* **2018**, *33*, 2009–2025. [CrossRef] [PubMed]
87. Morgand, M.; Buffet, M.; Busson, M.; Loiseau, P.; Malot, S.; Amokrane, K.; Fortier, C.; London, J.; Bonmarchand, G.; Wynckel, A.; et al. High prevalence of infectious events in thrombotic thrombocytopenic purpura and genetic relationship with toll-like receptor 9 polymorphisms: Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Transfusion* **2014**, *54*, 389–397. [CrossRef]
88. Popović, M.; Smiljanić, K.; Dobutović, B.; Syrovets, T.; Simmet, T.; Isenović, E.R. Human cytomegalovirus infection and atherothrombosis. *J. Thromb. Thrombolysis* **2012**, *33*, 160–172. [CrossRef]
89. Bernardo, A.; Ball, C.; Nolasco, L.; Moake, J.F.; Dong, J.-F. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell–derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* **2004**, *104*, 100–106. [CrossRef]
90. Kavanagh, D.; McGlasson, S.; Jury, A.; Williams, J.; Scolding, N.; Bellamy, C.; Gunther, C.; Ritchie, D.; Gale, D.; Kanwar, Y.S.; et al. Type I interferon causes thrombotic microangiopathy by a dose-dependent toxic effect on the microvasculature. *Blood* **2016**, *128*, 2824–2833. [CrossRef]

91. Cao, W.J.; Niiya, M.; Zheng, X.W.; Shang, D.Z. Inflammatory cytokines inhibit ADAMTS13 synthesis in hepatic stellate cells and endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* **2008**, *6*, 1233–1235. [CrossRef]
92. Malak, S.; Wolf, M.; Millot, G.A.; Mariotte, E.; Veyradier, A.; Meynard, J.-L.; Korach, J.-M.; Malot, S.; Bussel, A.; Azoulay, E.; et al. Human Immunodeficiency Virus-Associated Thrombotic Microangiopathies: Clinical Characteristics and Outcome According to ADAMTS13 Activity. *Scand. J. Immunol.* **2008**, *68*, 337–344. [CrossRef] [PubMed]
93. del Arco, A.; Martinez, M.A.; Peña, J.M.; Gamallo, C.; González, J.J.; Barbado, F.J.; Vazquez, J.J. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with human immunodeficiency virus infection: Demonstration of p24 antigen in endothelial cells. *Clin. Infect. Dis.* **1993**, *17*, 360–363. [CrossRef] [PubMed]
94. Tehrani, H.A.; Darnahal, M.; Vaezi, M.; Haghighi, S. COVID-19 associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP); A case series and mini-review. *Int. Immunopharmacol.* **2021**, *93*, 107397. [CrossRef]
95. Ward, S.E.; Curley, G.F.; Lavin, M.; Fogarty, H.; Karampini, E.; McEvoy, N.L.; Clarke, J.; Boylan, M.; Alalqam, R.; Worrall, A.P.; et al. Von Willebrand factor propeptide in severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): Evidence of acute and sustained endothelial cell activation. *Br. J. Haematol.* **2021**, *192*, 714–719. [CrossRef] [PubMed]
96. Flaumenhaft, R.; Enjyoji, K.; Schmaier, A.A. Vasculopathy in COVID-19. *Blood* **2022**, *140*, 222–235. [CrossRef] [PubMed]
97. Lei, Y.; Zhang, J.; Schiavon, C.R.; He, M.; Chen, L.; Shen, H.; Shyy, J.Y. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circ. Res.* **2021**, *128*, 1323–1326. [CrossRef] [PubMed]
98. McCracken, I.R.; Saginc, G.; He, L.; Huseynov, A.; Daniels, A.; Fletcher, S.; Randi, A.M. Lack of Evidence of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Expression and Replicative Infection by SARS-CoV-2 in Human Endothelial Cells. *Circulation* **2021**, *143*, 865–868. [CrossRef]
99. Zakarija, A.; Kwaan, H.C.; Moake, J.L.; Bandarenko, N.; Pandey, D.K.; McKoy, J.M.; Yarnold, P.R.; Raisch, D.W.; Winters, J.L.; Raife, T.J.; et al. Ticlopidine- and clopidogrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): Review of clinical, laboratory, epidemiological, and pharmacovigilance findings (1989–2008). *Kidney Int.* **2009**, *75*, S20–S24. [CrossRef]
100. Mauro, M.; Zlatopolskiy, A.; Raife, T.J.; Laurence, J. Thienopyridine-linked thrombotic microangiopathy: Association with endothelial cell apoptosis and activation of MAP kinase signalling cascades. *Br. J. Haematol.* **2004**, *124*, 200–210. [CrossRef]
101. Coppo, P.; Busson, M.; Veyradier, A.; Wynckel, A.; Poullin, P.; Azoulay, E.; Galicier, L.; Loiseau, P. HLA-DRB1*11: A strong risk factor for acquired severe ADAMTS13 deficiency-related idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in Caucasians. *J. Thromb. Haemost.* **2010**, *8*, 856–859. [CrossRef]
102. Scully, M.; Brown, J.; Patel, R.; Mcdonald, V.; Brown, C.J.; Machin, S. Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: Evidence for an immunogenetic link. *J. Thromb. Haemost.* **2010**, *8*, 257–262. [CrossRef] [PubMed]
103. Sorvillo, N.; van Haren, S.; Kaijen, P.H.; Brinke, A.T.; Fijnheer, R.; Meijer, A.B.; Voorberg, J. Preferential HLA-DRB1*11–dependent presentation of CUB2-derived peptides by ADAMTS13-pulsed dendritic cells. *Blood* **2013**, *121*, 3502–3510. [CrossRef] [PubMed]
104. Verbij, F.C.; Turksma, A.W.; de Heij, F.; Kaijen, P.; Lardy, N.; Fijnheer, R.; Sorvillo, N.; Brinke, A.T.; Voorberg, J. CD4+ T cells from patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura recognize CUB2 domain-derived peptides. *Blood* **2016**, *127*, 1606–1609. [CrossRef] [PubMed]
105. Praprotnik, S.; Blank, M.; Levy, Y.; Tavor, S.; Boffa, M.-C.; Weksler, B.; Eldor, A.; Shoenfeld, Y. Anti-endothelial cell antibodies from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura specifically activate small vessel endothelial cells. *Int. Immunol.* **2001**, *13*, 203–210. [CrossRef] [PubMed]
106. Wright, J.F.; Wang, H.; Hornstein, A.; Hogarth, M.; Mody, M.; Garvey, M.B.; Blanchette, V.; Rock, G.; Freedman, J. Characterization of platelet glycoproteins and platelet/endothelial cell antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **1999**, *107*, 546–555. [CrossRef] [PubMed]
107. Tandon, N.N.; Rock, G.; Jamieson, G.A. Anti-CD36 antibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **1994**, *88*, 816–825. [CrossRef]
108. Raife, T.J.; Atkinson, B.; Aster, R.H.; McFarland, J.G.; Gottschall, J.L. Minimal evidence of platelet and endothelial cell reactive antibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Hematol.* **1999**, *62*, 82–87. [CrossRef]
109. Drachenberg, C.B.; Papadimitriou, J.C. Endothelial injury in renal antibody-mediated allograft rejection: A schematic view based on pathogenesis. *Transplantation* **2013**, *95*, 1073–1083. [CrossRef]
110. Rena, G.; Hack, B.K.; Minto, A.W.; Cunningham, P.N.; Alexander, J.J.; Haasb, M.; Quigg, R.J. A Complement-Dependent Model of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Induced by Antibodies Reactive with Endothelial Cells. *Clin. Immunol.* **2002**, *103*, 43–53. [CrossRef]
111. Chang, J.C.; Shipstone, A.; Llenado-Lee, M.A. Postoperative thrombotic thrombocytopenic purpura following cardiovascular surgeries. *Am. J. Hematol.* **1996**, *53*, 11–17. [CrossRef]
112. Jackson, S.P.; Darbousset, R.; Schoenwaelder, S.M. Thromboinflammation: Challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood* **2019**, *133*, 906–918. [CrossRef] [PubMed]
113. Namal Rathnayaka, R.; Ranathunga, P.A.N.; Kularatne, S.A. Thrombotic Microangiopathy, Hemolytic Uremic Syndrome, and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Following Hump-nosed Pit Viper (Genus: Hypnale) Envenoming in Sri Lanka. *Wilderness Environ. Med.* **2019**, *30*, 66–78. [CrossRef] [PubMed]
114. Tan, C.H.; Tan, N.H.; Sim, S.M.; Fung, S.Y.; Gnanathasan, C.A. Proteomic investigation of Sri Lankan hump-nosed pit viper (Hypnale hypnale) venom. *Toxicon* **2015**, *93*, 164–170. [CrossRef]

115. Vanuopadath, M.; Sajeev, N.; Murali, A.R.; Sudish, N.; Kangosseri, N.; Sebastian, I.R.; Jain, N.D.; Pal, A.; Raveendran, D.; Nair, B.G.; et al. Mass spectrometry-assisted venom profiling of Hypnale hypnale found in the Western Ghats of India incorporating de novo sequencing approaches. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *118*, 1736–1746. [CrossRef] [PubMed]
116. Noris, M.; Remuzzi, G. Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin. Nephrol.* **2013**, *33*, 479–492. [CrossRef] [PubMed]
117. Fakhouri, F.; Zuber, J.; Frémeaux-Bacchi, V.; Loirat, C. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **2017**, *390*, 681–696. [CrossRef] [PubMed]
118. Orth, D.; Khan, A.B.; Naim, A.; Grif, K.; Brockmeyer, J.; Karch, H.; Joannidis, M.; Clark, S.J.; Day, A.J.; Fidanzi, S.; et al. Shiga Toxin Activates Complement and Binds Factor H: Evidence for an Active Role of Complement in Hemolytic Uremic Syndrome. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 6394–6400. [CrossRef] [PubMed]
119. Brady, T.M.; Pruette, C.; Loeffler, L.F.; Weidemann, D.; Strouse, J.J.; Gavriilaki, E.; Brodsky, R.A. Typical Hus: Evidence of Acute Phase Complement Activation from a Daycare Outbreak. *J. Clin. Exp. Nephrol.* **2016**, *1*, 11. [CrossRef]
120. Burwick, R.M.; Fichorova, R.N.; Dawood, H.Y.; Yamamoto, H.S.; Feinberg, B.B. Urinary excretion of C5b-9 in severe preeclampsia: Tipping the balance of complement activation in pregnancy. *Hypertension* **2013**, *62*, 1040–1045. [CrossRef]
121. Jodele, S.; Licht, C.; Goebel, J.; Dixon, B.; Zhang, K.; Sivakumaran, T.A.; Davies, S.M.; Pluthero, F.; Lu, L.; Laskin, B.L. Abnormalities in the alternative pathway of complement in children with hematopoietic stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Blood* **2013**, *122*, 2003–2007. [CrossRef]
122. Jodele, S.; Zhang, K.; Zou, F.; Laskin, B.; Dandoy, C.; Myers, K.C.; Lane, A.; Meller, J.; Medvedovic, M.; Chen, J.; et al. The genetic fingerprint of susceptibility for transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Blood* **2016**, *127*, 989–996. [CrossRef] [PubMed]
123. de Fontbrune, F.S.; Galambrun, C.; Sirvent, A.; Huynh, A.; Faguer, S.; Nguyen, S.; de Latour, R.P. Use of Eculizumab in Patients with Allogeneic Stem Cell Transplant-Associated Thrombotic Microangiopathy: A Study From the SFGM-TC. *Transplantation* **2015**, *99*, 1953–1959. [CrossRef] [PubMed]
124. Westwood, J.-P.; Langley, K.; Heelas, E.; Machin, S.J.; Scully, M. Complement and cytokine response in acute Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Br. J. Haematol.* **2014**, *164*, 858–866. [CrossRef] [PubMed]
125. Bettoni, S.; Galbusera, M.; Gastoldi, S.; Donadelli, R.; Tentori, C.; Spartà, G.; Bresin, E.; Mele, C.; Alberti, M.; Tortajada, A.; et al. Interaction between Multimeric von Willebrand Factor and Complement: A Fresh Look to the Pathophysiology of Microvascular Thrombosis. *J. Immunol.* **2017**, *199*, 1021–1040. [CrossRef] [PubMed]
126. Wu, T.C.; Yang, S.; Haven, S.; Holers, V.M.; Lundberg, A.S.; Wu, H.; Cataland, S.R. Complement activation and mortality during an acute episode of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* **2013**, *11*, 1925–1927. [CrossRef] [PubMed]
127. Cataland, S.R.; Holers, V.M.; Geyer, S.; Yang, S.; Wu, H.M. Biomarkers of terminal complement activation confirm the diagnosis of aHUS and differentiate aHUS from TTP. *Blood* **2014**, *123*, 3733–3738. [CrossRef]
128. Tati, R.; Kristoffersson, A.-C.; Ståhl, A.-L.; Rebetz, J.; Wang, L.; Licht, C.; Motto, D.; Karpman, D. Complement Activation Associated with ADAMTS13 Deficiency in Human and Murine Thrombotic Microangiopathy. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 2184–2193. [CrossRef]
129. Sinkovits, G.; Farkas, P.; Csuka, D.; Rázsó, K.; Réti, M.; Radványi, G.; Demeter, J.; Prohászka, Z.; Mikes, B. Carboxiterminal pro-endothelin-1 as an endothelial cell biomarker in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Haemost.* **2016**, *115*, 1034–1043. [CrossRef]
130. Turner, N.; Sartain, S.; Moake, J. Ultralarge Von Willebrand Factor–Induced Platelet Clumping and Activation of the Alternative Complement Pathway in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and the Hemolytic-Uremic Syndromes. *Hematol. Clin. North Am.* **2015**, *29*, 509–524. [CrossRef]
131. Feng, S.; Liang, X.; Kroll, M.H.; Chung, D.W.; Afshar-Kharghan, V. von Willebrand factor is a cofactor in complement regulation. *Blood* **2015**, *125*, 1034–1037. [CrossRef]
132. Zheng, L.; Zhang, D.; Cao, W.; Song, W.-C.; Zheng, X.L. Synergistic effects of ADAMTS13 deficiency and complement activation in pathogenesis of thrombotic microangiopathy. *Blood* **2019**, *134*, 1095–1105. [CrossRef] [PubMed]
133. Lorant, D.E.; Topham, M.K.; Whatley, R.E.; McEver, R.P.; McIntyre, T.M.; Prescott, S.M.; Zimmerman, G.A. Inflammatory roles of P-selectin. *J. Clin. Investig.* **1993**, *92*, 559–570. [CrossRef] [PubMed]
134. Morigi, M.; Galbusera, M.; Gastoldi, S.; Locatelli, M.; Buelli, S.; Pezzotta, A.; Pagani, C.; Noris, M.; Gobbi, M.; Stravalaci, M.; et al. Alternative Pathway Activation of Complement by Shiga Toxin Promotes Exuberant C3a Formation That Triggers Microvascular Thrombosis. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 172–180. [CrossRef] [PubMed]
135. Foreman, K.E.; Vaporciyan, A.A.; Bonish, B.K.; Jones, M.L.; Johnson, K.J.; Glovsky, M.M.; Eddy, S.M.; A Ward, P. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J. Clin. Investig.* **1994**, *94*, 1147–1155. [CrossRef] [PubMed]
136. Tedesco, F.; Pausa, M.; Nardon, E.; Introna, M.; Mantovani, A.; Dobrina, A. The Cytolytically Inactive Terminal Complement Complex Activates Endothelial Cells to Express Adhesion Molecules and Tissue Factor Procoagulant Activity. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 1619–1628. [CrossRef]
137. Ruiz-Torres, M.P.; Casiraghi, F.; Galbusera, M.; Macconi, D.; Gastoldi, S.; Todeschini, M.; Porrati, F.; Belotti, D.; Pogliani, E.M.; Remuzzi, G.; et al. Complement activation: The missing link between ADAMTS-13 deficiency and microvascular thrombosis of thrombotic microangiopathies. *Thromb. Haemost.* **2005**, *93*, 443–452. [CrossRef]
138. del Conde, I.; Crúz, M.A.; Zhang, H.; López, J.A.; Afshar-Kharghan, V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 871–879. [CrossRef]

139. Chapin, J.; Weksler, B.; Magro, C.; Laurence, J. Eculizumab in the treatment of refractory idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **2012**, *157*, 772–774. [CrossRef]
140. Tsai, E.; Chapin, J.; Laurence, J.C.; Tsai, H.-M. Use of eculizumab in the treatment of a case of refractory, ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura: Additional data and clinical follow-up. *Br. J. Haematol.* **2013**, *162*, 558–559. [CrossRef]
141. Pecoraro, C.; Ferretti, A.V.S.; Rurali, E.; Galbusera, M.; Noris, M.; Remuzzi, G. Treatment of Congenital Thrombotic Thrombocytopenic Purpura with Eculizumab. *Am. J. Kidney Dis.* **2015**, *66*, 1067–1070. [CrossRef]
142. Vigna, E.; Petrungaro, A.; Perri, A.; Terzi, D.; Recchia, A.G.; Mendicino, F.; La Russa, A.; Bossio, S.; De Stefano, L.; Zinno, F.; et al. Efficacy of eculizumab in severe ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) refractory to standard therapies. *Transfus. Apher. Sci.* **2018**, *57*, 247–249. [CrossRef] [PubMed]
143. Rother, R.P.; Bell, L.; Hillmen, P.; Gladwin, M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: A novel mechanism of human disease. *JAMA* **2005**, *293*, 1653–1662. [CrossRef] [PubMed]
144. Vinchi, F.; De Franceschi, L.; Ghigo, A.; Townes, T.; Cimino, J.; Silengo, L.; Hirsch, E.; Altruda, F.; Tolosano, E. Hemopexin Therapy Improves Cardiovascular Function by Preventing Heme-Induced Endothelial Toxicity in Mouse Models of Hemolytic Diseases. *Circulation* **2013**, *127*, 1317–1329. [CrossRef] [PubMed]
145. Matsushita, K.; Morrell, C.N.; Cambien, B.; Yang, S.-X.; Yamakuchi, M.; Bao, C.; Hara, M.R.; Quick, R.A.; Cao, W.; O'Rourke, B.; et al. Nitric Oxide Regulates Exocytosis by S-Nitrosylation of N-ethylmaleimide-Sensitive Factor. *Cell* **2003**, *115*, 139–150. [CrossRef] [PubMed]
146. Studt, J.-D.; Hovinga, J.A.K.; Antoine, G.; Hermann, M.; Rieger, M.; Scheiflinger, F.; Lämmle, B. Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: In vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood* **2005**, *105*, 542–544. [CrossRef]
147. Merle, N.S.; Paule, R.; Leon, J.; Daugan, M.; Robe-Rybkine, T.; Poillerat, V.; Roumenina, L.T. P-selectin drives complement attack on endothelium during intravascular hemolysis in TLR-4/heme-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 6280–6285. [CrossRef]
148. May, O.; Merle, N.S.; Grunenwald, A.; Gnemmi, V.; Leon, J.; Payet, C.; Robe-Rybkine, T.; Paule, R.; Delguste, F.; Satchell, S.C.; et al. Heme Drives Susceptibility of Glomerular Endothelium to Complement Overactivation Due to Inefficient Upregulation of Heme Oxygenase-1. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 3008. [CrossRef]
149. Frimat, M.; Tabarin, F.; Dimitrov, J.; Poitou, C.; Halbwachs-Mecarelli, L.; Fremeaux-Bacchi, V.; Roumenina, L. Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* **2013**, *122*, 282–292. [CrossRef]
150. Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **2004**, *303*, 1532–1535. [CrossRef]
151. Fuchs, T.A.; Brill, A.; Duerschmied, D.; Schatzberg, D.; Monestier, M.; Myers, D.D., Jr.; Wrobleski, S.K.; Wakefield, T.W.; Hartwig, J.H.; Wagner, D.D. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 15880–15885. [CrossRef]
152. Fuchs, T.A.; Bhandari, A.A.; Wagner, D.D. Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. *Blood* **2011**, *118*, 3708–3714. [CrossRef] [PubMed]
153. Fuchs, T.A.; Hovinga, J.A.K.; Schatzberg, D.; Wagner, D.D.; Lämmle, B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood* **2012**, *120*, 1157–1164. [CrossRef] [PubMed]
154. Ramos, M.V.; Mejias, M.P.; Sabbione, F.; Fernandez-Brando, R.J.; Santiago, A.P.; Amaral, M.M.; Exeni, R.; Trevani, A.S.; Palermo, M.S. Induction of Neutrophil Extracellular Traps in Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *J. Innate Immun.* **2016**, *8*, 400–411. [CrossRef] [PubMed]
155. Gloude, N.J.; Khandelwal, P.; Luebbering, N.; Lounder, D.T.; Jodele, S.; Alder, M.N.; Lane, A.; Wilkey, A.; Lake, K.E.; Litts, B.; et al. Circulating dsDNA, endothelial injury, and complement activation in thrombotic microangiopathy and GVHD. *Blood* **2017**, *130*, 1259–1266. [CrossRef]
156. Yuen, J.; Pluthero, F.G.; Douda, D.N.; Riedl, M.; Cherry, A.; Ulanova, M.; Kahr, W.H.A.; Palaniyar, N.; Licht, C. NETosing Neutrophils Activate Complement Both on Their Own NETs and Bacteria via Alternative and Non-alternative Pathways. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 137. [CrossRef] [PubMed]
157. Miyata, T.; Fan, X. A second hit for TMA. *Blood* **2012**, *120*, 1152–1154. [CrossRef]
158. Padilla, A.; Moake, J.L.; Bernardo, A.; Ball, C.; Wang, Y.; Arya, M.; Nolasco, L.; Turner, N.; Berndt, M.C.; Anvari, B.; et al. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood* **2004**, *103*, 2150–2156. [CrossRef]
159. El-Mansi, S.; Nightingale, T.D. Emerging mechanisms to modulate VWF release from endothelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2021**, *131*, 105900. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Mes travaux de thèse de doctorat ont été réalisés au sein du Centre de Recherche en Cardiovasculaire et Nutrition (C2VN) sous la direction du Professeur Gilles Kaplanski et du Dr Edwige Tellier, dans l'équipe 3 nommée « Endothélium, Cellules circulantes et Maladies vasculaires ». Une partie de ce travail de Thèse a également été réalisée durant les périodes de vagues épidémiques de COVID-19 (unités COVID-19, hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille).

1. Hypothèse et objectifs du travail

Comme détaillé dans l'introduction bibliographique, l'activation endothéliale (notamment l'activation calcium-dépendante) est au cœur de la physiopathologie du PTT avec un rôle dual : elle induit une dégranulation endothéliale et donc la libération importante de multimères de vWF, et constitue donc un facteur « précipitant » de l'épisode aigu de PTT ; et elle peut être si intense qu'elle peut conduire à la mort de la cellule endothéliale. Les cellules endothéliales décollées se retrouvent alors dans la circulation, et la matrice sous-endothéliale, très prothrombotique, est exposée.

Basé sur ces données, **mes hypothèses de travail** ont été 1) le détachement des cellules endothéliales au cours du PTT est une conséquence de l'activation endothéliale, et est médié par un mécanisme dépendant de la phosphorylation de la VE-cadhérine et 2) que l'inhibition de cette activation endothéliale diminue la sévérité du PTT.

Comme illustré dans la Figure 36, mon travail expérimental a donc eu deux axes principaux : 1) étudier des mécanismes moléculaires dépendants de la VE-cadhérine à l'origine du décollement cellulaire au cours du PTT. Ce travail a fait l'objet d'un article soumis dans le *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (IF 16), et est en cours de révision ; 2) tester un inhibiteur de la dégranulation endothéliale dans un modèle de PTT. Nous avons utilisé le peptide ITF1697, décrit comme inhibiteur de l'activation endothéliale calcium-dépendante.

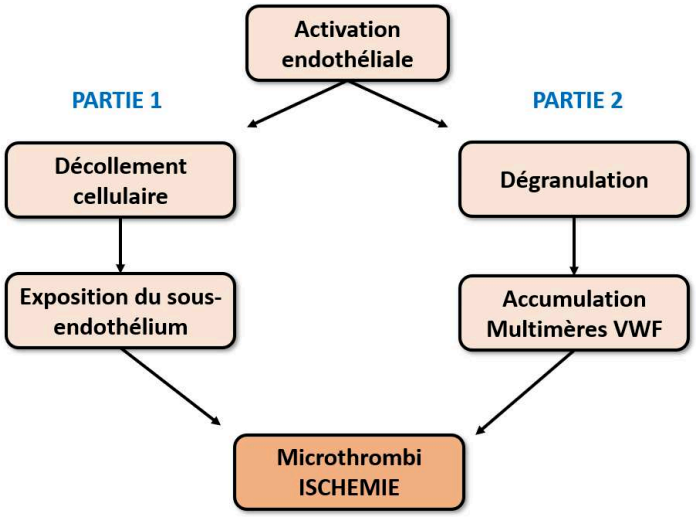


Figure 36: Illustration des deux axes de recherche concernant le PTT au cours de ma thèse

Cette thèse s'est en majeure partie déroulée durant la période pandémique de COVID-19 (Figure 37). En tant que médecin interniste, j'ai à 3 reprises participé activement au fonctionnement des unités COVID-19 à l'hôpital de la Conception, en tant que PHC. Il est vite apparu que les formes sévères de COVID-19 et les microangiopathies thrombotiques avaient de nombreux points d'accroche dans leur physiopathologie, notamment dans ce qui concerne l'activation endothéliale et les acteurs impliqués au cours de l'immunothrombose.

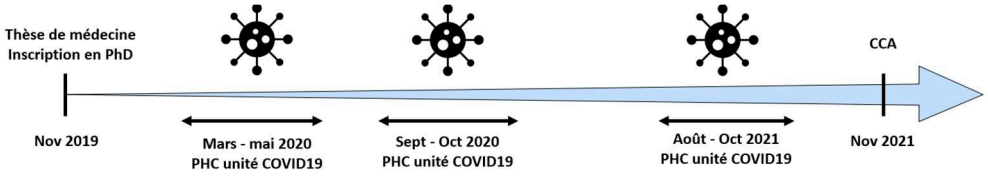


Figure 37: Frise chronologique des deux premières années de PhD

En plus de la pratique clinique, j'ai pu mettre en application certaines compétences acquises au cours de ma thèse de science pour avoir une activité de recherche clinique, notamment pour 1) proposer un traitement anti-inflammatoire adéquat pour les formes sévères et 2) identifier un biomarqueur pronostique des formes sévères. Nous avons ainsi étudié le bénéfice de l'utilisation de la forme recombinante de l'IL-1Ra chez ces patients. Cette série, l'une des premières concernant cette molécule dans le COVID-19, a été publié dans *PNAS* en 2020 (*Cauchois et al, Early IL-1 receptor blockade in severe inflammatory respiratory failure complicating COVID-19, PNAS 2020*). Par ailleurs, nous avons également étudié l'éosinopénie comme facteur prédictif de formes sévères de COVID-19 dans une série de 551 patients hospitalisés (*Cauchois et al, Eosinopenia as Predictor of Poor Outcome in Hospitalized, COVID-19 Adult Patients from Waves 1 and 2 of 2020 Pandemic, Microorganisms 2022*).

2. Exploration du décollement endothélial au cours du PTT

2.1 Contexte

Comme décrit précédemment, il existe un continuum entre l'activation endothéliale calcium-dépendante observée chez les patients et le décollement « lésionnel » des cellules endothéliales. En effet les **plasmas des patients PTTi induisent une activation endothéliale calcium- et IgG-dépendante**, qui induit la libération brutale des multimères de vWF. L'activation endothéliale calcium-dépendante est un mécanisme décrit dans la littérature comme inducteur d'une **déstabilisation des jonctions inter-endothéliales**, et que cette déstabilisation est liée en grande partie à la phosphorylation et à l'internalisation de la VE-Cadhérine. Enfin, les **patients atteints de PTTi en phase aiguë ont des taux de CEC élevés** associés à la sévérité du PTTi. Le décollement de ces cellules endothéliales participe vraisemblablement au phénotype prothrombotique local car la matrice sous endothéliale est exposée au sang circulant.

Notre hypothèse de travail a donc été que l'activation endothéliale induit la phosphorylation et l'internalisation de la VE-Cadhérine et le décollement des cellules endothéliales dans le PTT et que cet effet est au moins en partie lié à la fraction IgG présente dans le plasma des patients.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé la plasmathèque de patients PTT (plasmas issus du 1er échange plasmatique, n = 53), des cellules endothéliales en culture (essentiellement des HUVEC) ainsi qu'un modèle murin de perméabilité vasculaire. Nous avons procédé par étapes :

1. Nous avons d'abord confirmé que les CEC étaient augmentées chez les patients atteints de PTTi, et que cette augmentation est associée à la sévérité, sur notre cohorte de patients.
2. Pour corroborer notre idée d'un continuum entre l'activation endothéliale calcium-dépendante et la lésion endothéliale, nous avons établi la corrélation existante entre le niveau de flux calcique intracellulaire déclenché par les plasmas sur des HUVEC, et le taux de CEC chez les mêmes patients.
3. Nous avons ensuite directement observé l'effet toxique des plasmas PTTi sur l'endothélium *in vitro* en quantifiant le décollement cellulaire par 2 méthodes complémentaires : quantifier les cellules sur le tapis endothélial et quantifier les cellules dans le surnageant d'HUVEC traitées par ces plasmas.
4. Pour comprendre les mécanismes engagés dans ce décollement cellulaire, nous avons étudié l'effet de plasmas ou d'IgG de patients PTTi sur la phosphorylation dépendante du calcium de la VE-Cadhérine par Western Blot, ainsi que son internalisation par immunofluorescence.
5. Enfin, nous avons étudié la modification de perméabilité induite par les plasmas de patients *in vivo*, et testé l'effet d'un inhibiteur du flux calcique intracellulaire.

Les résultats de ce travail ont été soumis au ***Journal of Thrombosis and Haemostasis*** (IF = 16). Pour faciliter la lecture dans le présent document, les figures et les légendes ont été placées à la suite du texte correspondant. La numérotation des figures est celle de l'article soumis (et se découple donc du reste de la numérotation des figures de ce manuscrit de thèse). A l'heure actuelle, nous réalisons des expériences au laboratoire en réponse aux remarques et questions des deux reviewers. La nature des expériences demandées est présentée à la suite de l'article soumis.

2.2 Article en révision (JTH, 2023)

journal of
thrombosis and haemostasis

VE-Cadherin is involved in endothelial cell detachment during Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

Journal:	*Journal of Thrombosis and Haemostasis*
Manuscript ID	JTH-2023-00785
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	30-Jun-2023
Complete List of Authors:	Cauchois, Raphael; Aix-Marseille Universite, APHM, INSERM, INRAE, C2VN, CHU Conception, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique; French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies Lagarde, Marie; Aix-Marseille Universite, Aix-Marseille Univ, INSERM, INRAE, C2VN, Marseille, France Muller, Romain; Aix-Marseille Universite, APHM, INSERM, INRAE, C2VN, CHU Conception, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique Faccini, Julien; Aix-Marseille Universite, APHM, INSERM, INRAE, C2VN, CHU Conception Leroyer, Aurelie; Aix-Marseille Universite, APHM, INSERM, INRAE, C2VN Laurent, Arnaud; Aix-Marseille Universite, APHM, INSERM, INRAE, C2VN Poullin, Pascale; APHM, CHU de la Conception, Service d'Hémaphérèse et d'Autotransfusion; French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies Dignat-George, Françoise; Aix-Marseille Universite, APHM, INSERM, INRAE, C2VN, CHU Timone, Laboratoire d'Hématologie, Marseille, France Kaplanski, Gilles; Aix-Marseille Universite, APHM, INSERM, INRAE, C2VN, CHU Conception, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique Tellier, Edwige; Aix-Marseille Universite, APHM, INSERM, INRAE, C2VN, CHU Conception, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Marseille, France; French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies
Key Words:	VE-Cadherin, Permeability, Thrombotic Thrombocytopenic Purpura, Circulating endothelial cell, Endothelial activation

SCHOLARONE™
Manuscripts

VE-Cadherin is involved in endothelial cell detachment during Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

Raphael Cauchois[1,2] ; Marie Lagarde[2,3] ; Romain Muller[1,2] ; Julien Faccini[3] ; Aurélie Leroyer[3] ; Laurent Arnaud[3] ; Pascale Poullin[4] ; Françoise Dignat-George[3,5] ; Gilles Kaplanski[1,2] and Edwige Tellier[2.3]

1. Aix-Marseille Univ, APHM, INSERM, INRAE, C2VN, CHU Conception, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Marseille, France.
2. French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies, Paris, France
3. Aix-Marseille Univ, INSERM, INRAE, C2VN, Marseille, France
4. APHM, Service d'Hémaphérèse, CHU Conception, Marseille, France
5. Aix-Marseille Univ, APHM, INSERM, INRAE, C2VN, CHU Timone, Laboratoire d'Hématologie, Marseille, France

Running Title : VE-Cadherin in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

Keywords : VE-Cadherin ; Permeability ; Endothelial cell ; Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

Word count : 3213

Corresponding author:
Raphael Cauchois
raphael.cauchois@ap-hm.fr
Service de Médecine Interne et Immunologique Clinique, Hôpital de la Conception
147 Bd Baille 13005 Marseille France

Authors contributions : RC, JF, RM, ML, AL, LA, and ET conducted the experiments and interpreted the data; PP, FDG, and GK contributed to sample collection and analysis of clinical data, RC and GK took care of patients, ET and GK supervised the project, RC and ET have drafted the manuscript.

Funding: none

Abstract

Immune Thrombotic thrombocytopenic purpura (i-TTP) is a life-threatening thrombotic microangiopathy. The main feature of this disease is ADAMTS13 deficiency leading to accumulation of Von Willebrand factor (vWF). It has long been suspected that endothelial cell activation is the precipitating factor of TTP crisis. Circulating endothelial cells (CEC) have been shown to be a biomarker of vascular injury and to be associated with the clinical severity of i-TTP crisis. However, the mechanisms leading to endothelial cell detachment remain unclear. Therefore, we investigated the mechanisms of detachment of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). In plasmas from i-TTP patients, we observed that the number of HUVEC was associated with disease severity and with intracellular calcium influx ($p<0.01$). *In vitro*, serum from i-TTP patients induced stronger detachment of HUVEC than serum from control patients ($p<0.001$). Plasma from i-TTP patients induced higher calcium-dependent phosphorylation ($p<0.05$) and internalization ($p<0.05$) of VE-cadherin compared to plasmas from control patients. This effect could be reproduced by a purified IgG fraction from plasma. Moreover, subcutaneous injection of i-TTP plasma into mice resulted in higher vascular permeability than plasma from control patients. An inhibitor of endothelial calcium influx, ITF1697, normalized this increase in permeability. Our results suggest that plasma-induced endothelial activation also leads to an increase in vascular permeability. They contribute to the understanding of the mechanisms behind the presence of elevated CECs in the blood of patients by linking endothelial activation to endothelial injury.

Introduction

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a life-threatening thrombotic microangiopathy (TMA) associated with severe ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motif 13) deficiency. This deficiency can be caused by mutations in the *adamts13* gene but is most commonly caused by anti-ADAMTS13 antibodies in immune-mediated TTP (i-TTP) [1]. The current pathophysiological paradigm suggests that ADAMTS13 deficiency leads to an accumulation of Ultra Large von Willebrand factor multimers (UL-VWF) which thereby form pro-thrombotic strings in microvessels. They induce massive platelet adhesion with the rapid formation of disseminated microthrombi, leading to the characteristic triad of thrombotic microangiopathies: organ ischemia, thrombocytopenia, and mechanical hemolytic anemia[2].

In addition to the central role of ADAMTS13 deficiency in TTP pathogenesis, endothelial cells, which are the major storage site of UL-VWF, have long been considered major players in TMA, especially in TTP [3]. Indeed, endothelial damage is observed in TTP, with the presence of histopathological features (swelling and necrosis of endothelial cells, subendothelial hyaline deposits), biological markers associated with endothelial activation, and commonly reported environmental triggers in patients and animal models[4,5]. Among endothelial markers, circulating endothelial cells (CECs), consisting of mature endothelial cells detached from the vessel wall[6], were identified in a TTP patient in 1993[7]. This was confirmed in a prospective multicenter study of 22 patients : CECs were elevated in the acute phase and normalized during remission, and a high CEC count at diagnosis was associated with clinical severity[8]. High CEC counts have also been documented as a prognostic marker in other TMA [9].

We have recently shown that plasma from patients with TTP induced *in vitro* a rapid calcium-dependent endothelial activation (ie, type 1 endothelial cell activation [10]) with the release of UL-VWF[11]. Moreover, the IgG fraction present in the patients' plasmas seems to be mainly responsible for this endothelial degranulation. Intracellular calcium flux acts as a danger signal that confers a pro-thrombotic and pro-inflammatory phenotype to endothelial cells and also induces increased vascular permeability, involving the degradation of VE-Cadherin, the major transmembrane protein of adherens junctions, also known as CD144[12].

Although CECs have long been observed in TTP, the mechanisms underlying cell detachment remain unclear. Intercellular adherens junctions are important components for the integrity of the endothelial monolayer. We, therefore, hypothesized that EC detachment is a consequence of strong endothelial activation leading to destabilization of intercellular adherens junctions.

Methods

Plasma and serum obtention

Plasma was obtained from patients enrolled in the prospective study Endo13 investigating endothelial biomarkers in i-TTP. Informed consent was obtained according to the Declaration of Helsinki. 53 patients were diagnosed with i-TTP, based on the following criteria: ischemic clinical events associated with mechanical hemolytic anemia (hemoglobin<100g/L), presence of schistocytes>2% on blood smears, peripheral thrombocytopenia (<150x109/L), low plasmatic ADAMTS13 activity (<5%, N:50-150%) and detection of anti- ADAMTS13 auto-antibodies in serum (N<20 IU/mL). 24 patients were classified as severe, ie, with a neurologic deficit or cardiac damage or who died in the acute phase, and 29 patients were classified as nonsevere. For each patient, plasma was obtained at the first plasmatic exchange (PEX). Serum was also collected at the same time for 16 of them. Plasma from patients with neurological autoimmune diseases treated with PEX formed the negative controls (myasthenia gravis or polyradiculoneuritis, n=13). To exclude the influence of endotoxin contamination of biological, all experiments were performed in the presence of 10µg/mL polymyxin B (Sigma- Aldrich, Saint Louis, USA).

Circulating endothelial cell count

CECs were assayed before the first plasma exchange from venous blood collected in EDTA tubes using a consensual morphological and immunological method[13]. Briefly, they were isolated by magnetic immune separation with beads coupled to an anti-CD146 antibody and counted according to morphological criteria under a fluorescence microscope after staining with acridine orange (cells > 15µm and each cell coupled to more than 5 beads).

Endothelial cell characterization by flow cytometry

Confluent Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) were treated for 8h with serums from i-TTP or Control patients (diluted 1/100 in basal medium, EBM2 from Lonza, Bâle, Swiss). Supernatants were collected and stained for 1h with PE-labeled anti-CD31 antibodies according to the manufacturer's instructions (Beckman Coulter, Brea, USA). FITC-labeled Annexin V (50ng/mL, Tau Technologies BV, Albuquerque, USA) and propidium iodide (5µg/mL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) were then added for 15 min. 300µL of 1X Annexin V Binding Buffer (Tau Technologies BV) and 30µL of flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter, Villepinte, France) were added and the EC were analyzed using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter).

Measurement of intracellular calcium flux

Confluent HUVEC were incubated for 1h with 5µM Fluo-4 AM fluorescent dye (ThermoFisher Scientific, USA) diluted in phosphate buffer saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin (BSA). Cells were washed with PBS and incubated with basal medium (EBM2, Lonza) alone for 30 minutes. Cells were finally incubated with 50µL/well of PBS-BSA1% for basal fluorescence measurement (GloMax® Multi Detection System, Promega), and then immediately incubated with i-TTP plasmas (1/100 diluted in PBS-BSA1%). Total fluorescence

intensity (FI) was measured at different time points during 30min and the area under the curve (AUC) was calculated using Prism. Basal fluorescence from each well was subtracted from post-stimulation values.

Isolation and quantification of IgG from i-TTP and control plasmas

IgG fraction was isolated from plasmas of i-TTP or control patients using GE Healthcare Protein A Mag Sepharose Xtra kit (GE Healthcare, Chicago, USA). Briefly, plasmas were diluted 1/5 in PBS without Ca2+ and Mg2+ (-/-) for a final volume of 300µL. 100µL of the beads were washed in binding buffer (PBS-/-, 100mM Na2HPO4, pH 7.4) and then added to the diluted plasma for 30 minutes on a rotor at 4°C. Beads were held on the magnetic bench and eluted with 100µl of elution buffer (H2O, 100mM glycine HCl, pH 2.8). The pH was adjusted with 5µl of buffer 1M TRIS-HCl pH 9. Samples were then dialyzed on Slide A Lyzer mini dialysis (Thermo Fisher Scientific) in PBS-/- with agitation overnight at 4°C. The isolated IgG were quantified using the FastElisa® Kit (RD-Biotech, Besançon, France) according to the supplier's recommendations, aliquoted, and stored at -80°C until use.

Western-blot assays

Confluent HUVEC were starved for 12 hours, then stimulated with plasma from i-TTP or Control patients (diluted 1/100 in EBM2) or 30µg of IgG from i-TTP or control patients, and then lysed in Ripa buffer (Tris-HCl 20mM pH 8.1, NaCl 137mM, NP40 1%, EDTA 2mM, TM protease inhibitor mini tablets (Thermo Fisher Scientific), NaF 1mM, orthovanadate 4mM). For experiments with intracellular calcium chelate, cells were pre-incubated with BAPTA-AM 10µM (Abcam, Cambridge, UK) for 1 hour before stimulation with plasma from i-TTP patients. Equal amounts of proteins were resolved by NuPAGE Bis-Tris 4-12% (Thermo Fisher Scientific), transferred to nitrocellulose membranes, and then immunoblotted after saturation with anti-VE-cadherin (Abcam), anti-phospho-VE-cadherin (Abcam, Cambridge, United Kingdom) or anti-actin antibodies (Cell Signaling, Danvers, USA) diluted in saturation buffer (TBS-Tween 0.05% BSA 5%). Secondary antibodies against rabbit IgG-conjugated HRP were from Thermo Fisher Scientific. Protein expressions were visualized using Gene Tools software (Syngene, USA) and quantified using ImageJ2.0 software (National Institute for Health, USA).

Immunofluorescence

HUVEC were cultured to confluence on LAB-TEK®II (ibidi GmbH, Graefelfing, Germany) pre-coated with gelatin 0.2% and then stimulated with medium alone (EBM2), TNFα (50 ng/mL), 30µg IgG from i-TTP patients or control patients. Since BAPTA-AM induces cell death quite rapidly, it could not be used for the internalization experiment. Therefore, we used another inhibitor of endothelial intracellular calcium flux that had been previously studied *in vivo* and *in vitro*, ITF1697[14,15] (100 µg/mL). After 24 hours of stimulation, cells were fixed with 200µL PFA 4% (Sigma-Aldrich) for 15 minutes at room temperature, then incubated for 10 minutes in a quench solution (NH4Cl 50mM), permeabilized with a solution of PBS -/- saponin 0.2% for 15 minutes and incubated for 1 hour in a saturating solution (PBS-/-, BSA 3%, SVF 5%, saponin 0.2%). Then, cells were incubated for 1 hour with a primary antibody (anti-VE-cadherin, Abcam) or rabbit isotype control IgG (Thermo Fisher Scientific) or phalloidin-SR101 (Interchim, Montluçon, France) in saturation buffer. Cells were washed twice with PBS

-/- Saponin 0.2% and then incubated with rabbit anti-IgG coupled with Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific) for 45 minutes, washed twice again, and incubated with a DAPI solution for 5 minutes. The mounting medium was Fluoromount-GTM (Thermo Fisher Scientific). Slides were kept at 4°C and viewed with a 20x or 63x magnification (DMi8 S microscope, Leica). Blind quantification was performed using ImageJ 2.0 software after the determination of intracellular areas.

In vivo permeability tests

All animal experiments were performed in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the "Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation" (APAFIS#12834-2018012519442632v3). C57Bl6/J male mice at 8 weeks of age were obtained from Janvier Labs. *In vivo* permeability was determined using a modified Miles assay[16]. In brief, 100µl of 1% Evans blue dye (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) diluted in 0.9% NaCl was retro-orbitally injected into mice after general anesthesia with Ketamine (125mg/kg), xylazine (12.5mg/kg) and atropine (0.25mg/kg). After five minutes, 40µl of plasma diluted 1/10 in PBS was injected intradermally. Twenty minutes later, mice were euthanized by cervical dislocation, and the shaved dorsal skin in the area of injection was excised with a calibration ring. The dye was extracted with formamide overnight at 55°C, and dye absorbance was measured at 630 nm. PBS and Histamine 100ng formed the negative and positive controls, respectively. To assess dependence on intracellular calcium flux during permeability, mice were treated with an endothelial calcium flux inhibitor, ITF169715,16 (4µg/mouse), provided by Italfarmaco (Milan, Italy).

Statistical analysis

Individual values are presented with median and interquartile ranges (25% and 75% percentile) for the indicated number of experiments. Data are compared using a non-parametric t-test (Mann-Whitney), non-parametric paired t-test (Wilcoxon) when adapted, or non-parametric correlation test, with GraphPad Prism v.9.2.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) in all data. All tests were two-sided, and a p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

The number of CEC is associated with disease severity and correlates with intracellular Ca^{2+} influx

We first quantified the CEC count in the plasma of i-TTP patients according to the severity of i-TTP. Severe patients had a higher CEC count than nonsevere patients (Figure 1A, 102[27-362] *vs* 20[4-47] cells/mL, p<0.01). In addition, we quantified intracellular calcium fluxes on HUVEC stimulated by i-TTP plasma from the same patients. We observed a significant positive statistical correlation between intracellular calcium influx *in vitro* and the CEC count (Figure 1B, r=0.64, p<0.01).

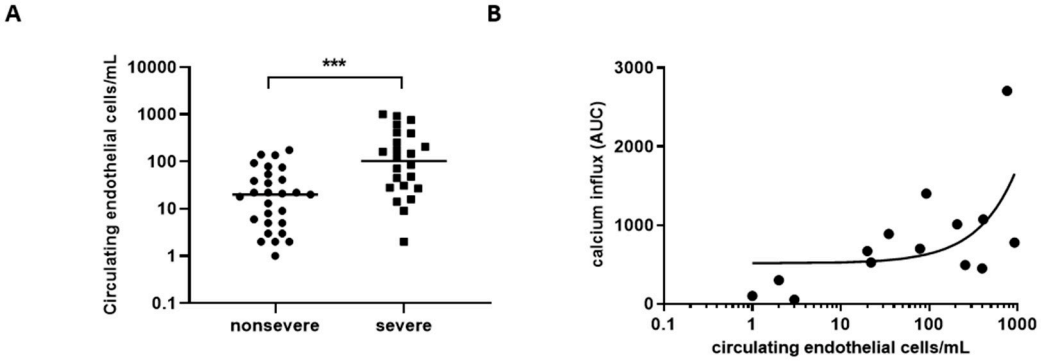


Figure 1: CEC count is associated with severity and correlated to intracellular Ca^{2+} influx

(A) CEC count (performed before the first plasmatic exchange) in nonsevere (n=29) and severe (n=24) patients (***p<0.001). 1 CEC value equal to 0 is excluded from the logarithmic plot, but is considered in the statistical analysis. (B) Correlation between patient CEC count and intracellular calcium influx induced with plasmas from same i-TTP patients (n=14, r [Spearman]= 0.64, p<0.01)

Serums from i-TTP patients induce CE detachment

We then analyzed the detachment of endothelial cells induced by i-TTP samples. For this experiment, it was necessary to use serum rather than plasma because plasma contains proteins, including fibrinogen, that deposit on cells and prevent them from detaching *in vitro*. We quantified the cells that detached from the endothelial monolayer by flow cytometry after 8h of stimulation by serums from i-TTP patients or controls, medium alone, or camptothecin as a positive control for cell death. Serums from i-TTP patients induced significantly higher detachment of endothelial cells than control serums (Figure 2A, 135[112-175] *vs* 99[92-105] cells/µL; p<0.001). In a complementary way, we quantified the number of cells remaining on the endothelial monolayer by immunofluorescence and observed a significant decrease in the number of cells remaining on the endothelial monolayer after stimulation with serum from i-TTP patients compared to control (Figure 2B and 2C, 109[74-116] *vs* 138[129-160] cells/field; p<0.01).

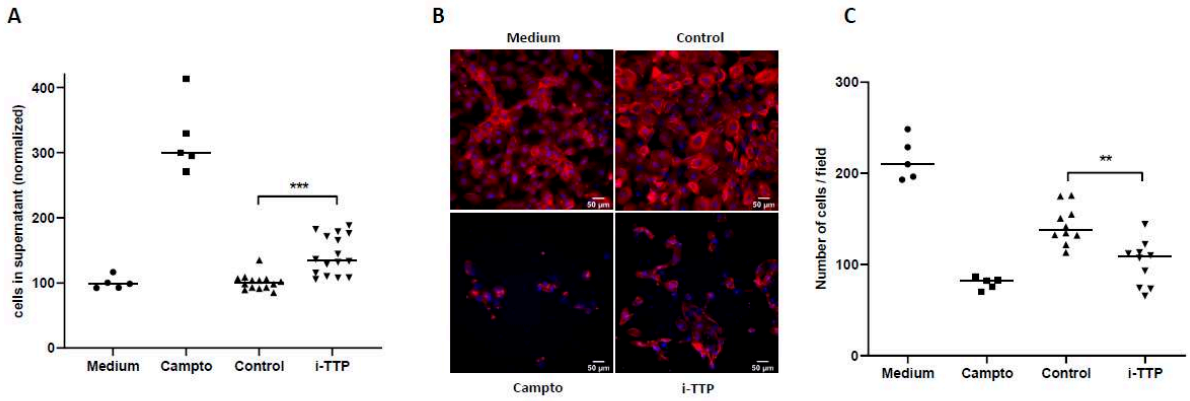


Figure 2: Serums from i-TTP patients induce endothelial cell detachment *in vitro*
(A) Quantification of cells in supernatants of HUVEC treated for 8h with medium (EBM2+1% FBS), Camptothecin (Campto, 3µmol/L, diluted in medium), serum 1/100 diluted from i-TTP patients (i-TTP, n=16) or control patients (control, n=14, ***p<0.001). Medium condition is used as a standard-setter (100%). **(B)** Immunofluorescence of HUVEC stimulated 24h with the same conditions. Red corresponds to the phalloidin staining and blue to the DAPI staining. **(C)** Quantification of cells in the cell layers after 24h of treatment like described in B. 5 fields are counted by conditions (n=10, **p<0.01).

Plasmas from i-TTP patients induce calcium-dependent phosphorylation of VE-cadherin

To investigate a loosening of endothelial junctions involving VE-cadherin, VE-cadherin phosphorylation was analyzed by Western blot. HUVEC were treated for five minutes with 10 plasmas from i-TTP or control patients, TNFα, or medium alone (Figure 3A). Quantification of chemiluminescence of the phospho-VE-cadherin compared with total VE-cadherin revealed that plasmas from i-TTP patients induced significantly higher VE-Cadherin phosphorylation than control plasmas (Figure 3B, 140[109-200] *vs* 115[90-143]%; $p<0.05$).

VE-cadherin phosphorylation is partly dependent on the Src activation. We thus analyzed the phosphorylation of Src induced by the plasmas from i-TTP or control patients, and we observed that plasmas from i-TTP patients induced a higher Src phosphorylation compared with plasma from control patients (figure 3C and 3D, 127[80-148] vs 100[73-114]%, $p<0.05$).

To investigate whether VE-cadherin phosphorylation induced with plasmas from i-TTP patients depends on an intracellular calcium influx, we performed the same experiment with or without BAPTA-AM, a Ca2+ chelator (Figure 3E). We observed that BAPTA-AM significantly decreased the ratio of phospho-VE-cadherin/VE-cadherin, preventing VE-Cadherin phosphorylation induced by the plasmas from i-TTP patients (Figure 3F, 79[61-93] vs 110[102-123]%; $p<0.05$).

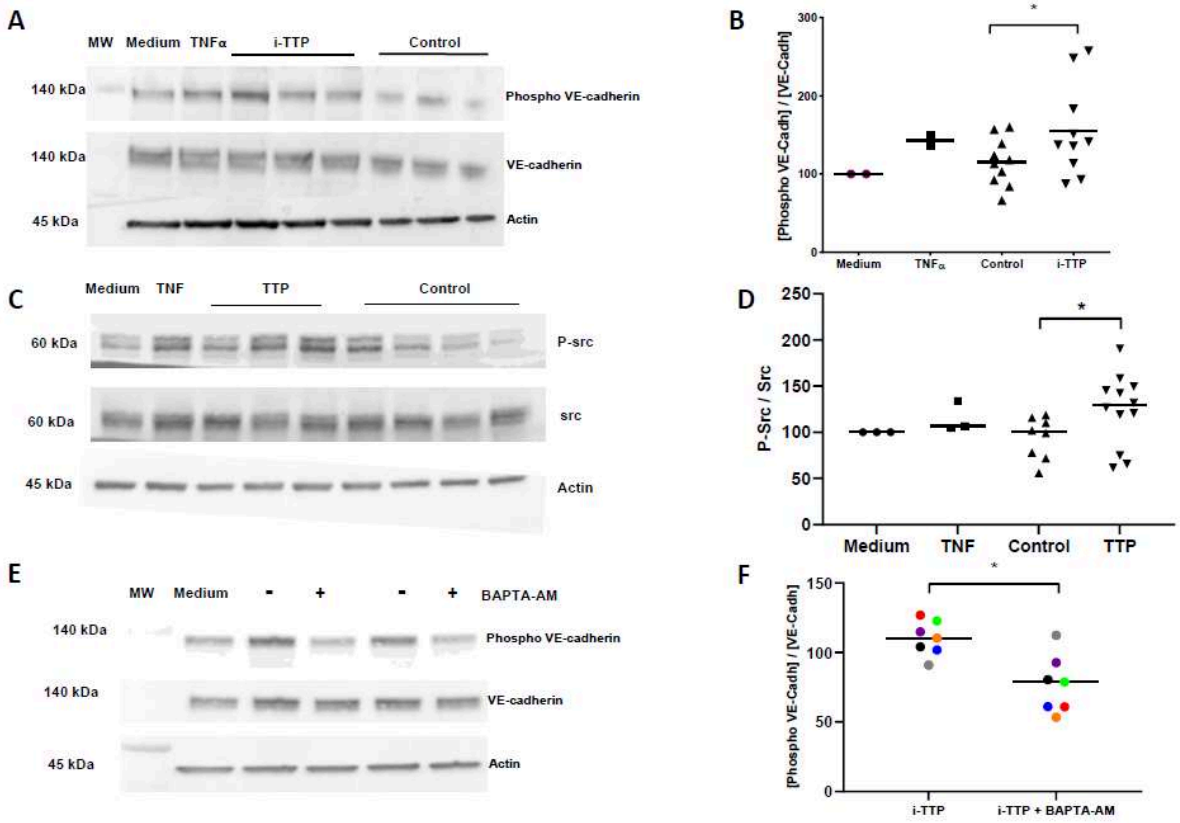


Figure 3: Plasmas from i-TTP patients induce Ca^{2+}-dependent phosphorylation of VE-cadherin
(A) Western blot of phosphorylated VE-cadherin and total VE-cadherin performed on 30µg of proteins from HUVEC stimulated for 5min with medium alone (EBM2), TNFα (50ng/mL), plasma 1/100 diluted from i-TTP patients or control patients. MW: molecular weight **(B)** Quantification of the phosphorylated VE-cadherin/VE-cadherin ratio, normalized with actin. Medium condition is used as a standard-setter (n=10, *p<0.05). **(C)** Western blot of phosphorylated Src and Src performed on 30µg of proteins from HUVEC stimulated for 5min with medium alone (EBM2), TNFα (50ng/mL), plasma 1/100 diluted from i-TTP patients or control patients. MW: molecular weight. **(D)** Quantification of the phosphorylated Src/Src ratio, normalized with actin. Medium condition is used as a standard-setter (n=13, *p<0.05). **(E)** Western blot of phosphorylated VE-cadherin and total VE-cadherin performed on 30µg of proteins from HUVEC stimulated for 5min by medium alone (EBM2), plasma 1/100 diluted from i-TTP patients alone (-) or with BAPTA-AM 10µM (+). **(F)** Quantification of the phosphorylated VE-cadherin/VE-cadherin ratio, normalized with actin. EBM2 is used as a standard setter (n=7, *p<0.05). The color of each dot corresponds to the same plasma of an i-TTP patient, with or without BAPTA-AM.

The phosphorylation of VE-cadherin by iTTP patients' plasma induces its internalization

Phosphorylation of VE-cadherin classically leads to the internalization of VE-Cadherin. We then stimulated HUVEC for 24h with plasmas from i-TTP or control patients, TNFα, or medium alone and analyzed the localization of VE-cadherin for each cell by immunofluorescence (Figure 4A). After quantification of the fluorescence, we observed that plasmas from i-TTP patients induced significantly greater internalization of VE-cadherin than control plasmas (Figure 4B, 185[167-219] *vs* 149[135-164]%; p<0.05).

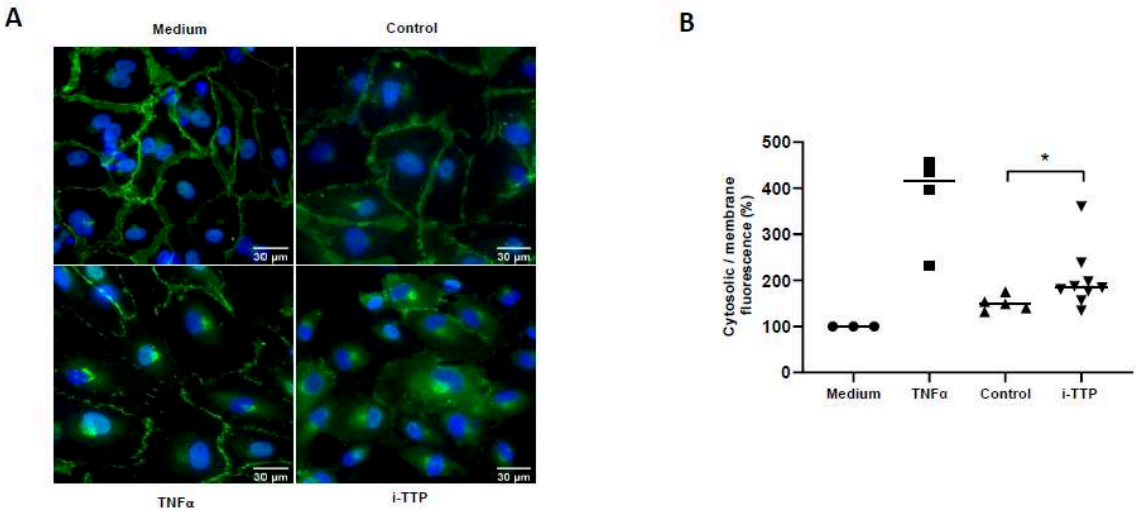


Figure 4: Plasmas from i-TTP patients induce internalization of VE-cadherin
(A) Immunofluorescence on HUVEC stimulated for 24h with medium (EBM2), TNFα (50ng/mL), plasma 1/100 diluted from i-TTP patients or control patients. Green corresponds to the total VE-cadherin staining and blue to the DAPI staining. **(B)** Cytosolic/membrane fluorescence ratio of VE-cadherin. Medium condition is used as a standard-setter (n=9, *p<0.05).

IgG from i-TTP patients reproduce the effects of plasmas

We have previously demonstrated that the main factors responsible for endothelial activation were the IgG fraction of i-TTP patients' plasma [11]. We then examined the effects of IgG purified from plasma i-TTP or control patients on phosphorylation and internalization of VE-cadherin. We first observed that IgG purified from i-TTP patients' plasmas induce significantly higher phosphorylation (Figure 5A and 5B, 133[95-143] vs 90[66-114]%, p<0.05) and internalization of VE-cadherin (Figure 5C and 5D, 185[198-465] vs 115[72-135]%; p<0.01), compared with IgG purified from control patients' plasmas.

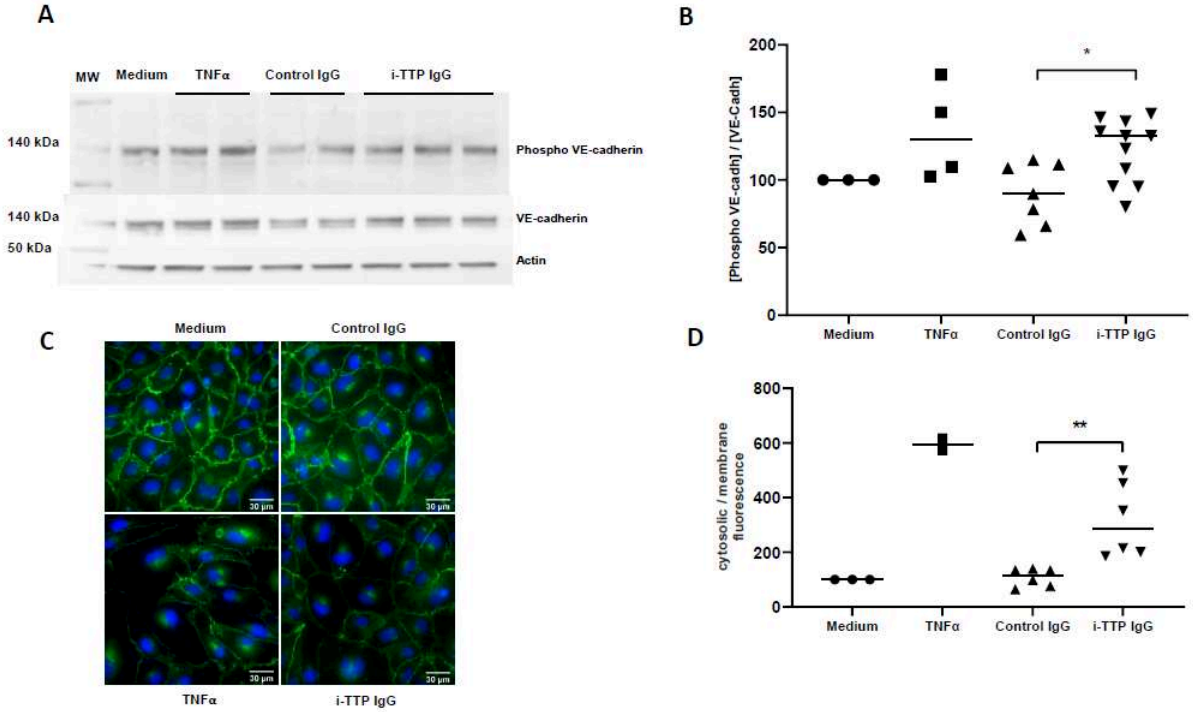


Figure 5: IgG from i-TTP patients mimic the effects of plasma on VE-cadherin phosphorylation and internalization

(A) Western blot of phosphorylated VE-cadherin and total VE-cadherin on 30µg of HUVECs stimulated for 5min by medium alone (EBM2), TNFα (50ng/mL), 30µg IgG from i-TTP patients or control patients. **(B)** Quantification of the phosphorylated VE-cadherin/VE-cadherin ratio, normalized with actin. Medium condition is used as a standard-setter (n=11, *p<0.05). **(C)** Immunofluorescence on HUVECs stimulated for 24h like in (A). Green corresponds to the VE-cadherin and blue to the DAPI staining. **(D)** Cytosolic/membrane fluorescence ratio of VE-cadherin. Medium condition is used as a standard-setter (n=6, **p<0.01).

Plasmas from i-TTP patients increase permeability *in vivo*

Internalization of VE-Cadherin by plasma of i-TTP patients *in vitro* may lead to destabilization of adherens junctions and should therefore increase vascular permeability *in vivo*. Using a mouse model of permeability, we, therefore, hypothesized that plasmas from i-TTP patients would increase vascular permeability. 19 plasmas from i-TTP patients (compared with 19 controls) were injected subcutaneously into wild-type mice in a Miles assay (Figure 6A). Plasmas from i-TTP patients were able to significantly increase vascular permeability (Figure 6B, 0.209[0.149-0.282] *vs* 0.152[0.130-0.187]; p<0.01) compared with control plasma. In addition, treatment with ITF1697, a tetrapeptide that inhibits endothelial intracellular calcium flux, significantly reduced i-TTP plasma-induced permeability (Figure 6B, 0.209[0.149-0.282] *vs* 0.141[0.099-0.192]; p<0,01), which returned to the level of control plasma. *In vitro*, ITF1697 reduced significantly VE-Cadherin phosphorylation induced by i-TTP plasmas (Figure 6C and 6D, 139[123-164] vs 166[128-214]%; p<0.05).

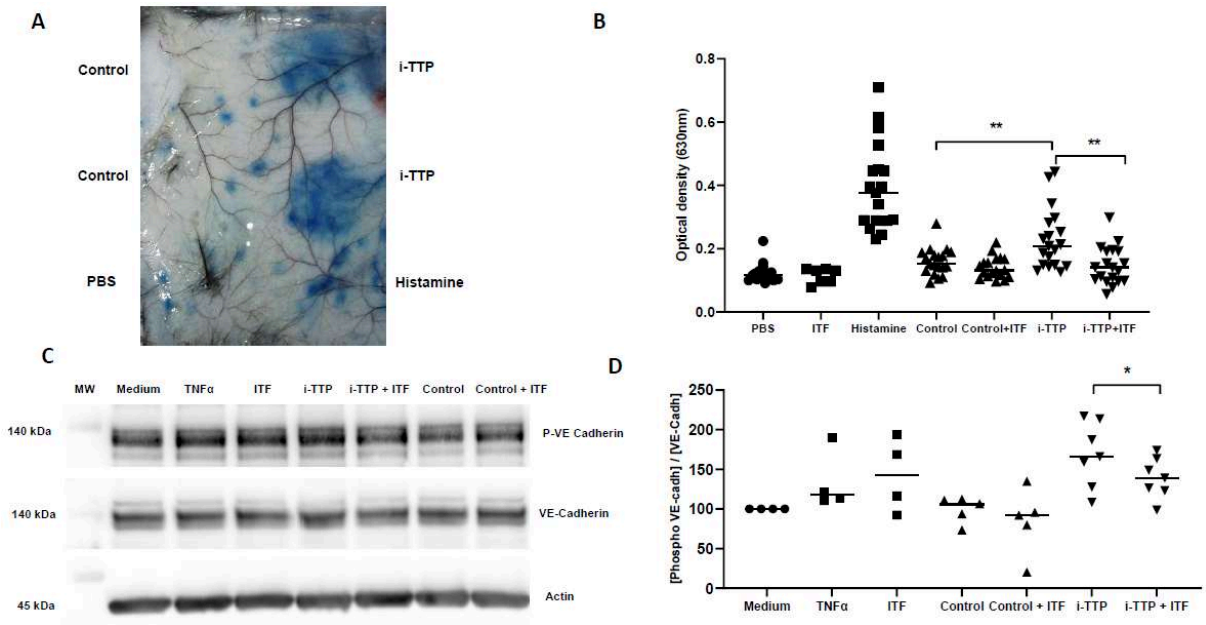


Figure 6: Plasmas from i-TTP patients increase calcium-dependent permeability *in vivo*
(A) Example of dorsal skin with the injection areas after a Miles assay realized with PBS, histamine, 2 plasmas from control patients, and 2 plasmas from i-TTP patients. **(B)** Quantification of *in vivo* permeability by optical density measurement. Miles Assay realized with PBS, histamine 100ng, control plasmas and i-TTP plasmas 1/10 diluted in PBS, with or without ITF1697 (ITF) 4µg/mouse (n=19, **p<0.01). **(C)** Western blot of phosphorylated VE-cadherin and VE-cadherin of HUVECs stimulated for 5min by Medium (EBM2, 1% SVF), i-TTP (n=7) or control plasmas (n=5) (1/100 diluted in medium) alone or with 100µg/mL ITF1697 (ITF). **(D)** Quantification of the phosphorylated VE-cadherin/VE-cadherin ratio, normalized with actin. Medium is used as standard-setter (n=7, *p<0.05).

Discussion

We demonstrated that i-TTP plasmas induce calcium-dependent phosphorylation of VE-cadherin, leading to its internalization. This destabilization of adherens junctions is involved in the detachment of endothelial cells observed *in vitro* and may explain the high level of CEC occurring in TTP crisis. Furthermore, we have shown that IgG from patients mimics these findings and are likely involved in plasma-induced endothelial activation. We have confirmed this permeability activation *in vivo* and have shown that this permeability can be modulated pharmacologically by ITF1697. This effect of ITF1697 of endothelial permeability has previously been described in the setting of ischemia-reperfusion [14]. Our results suggest that the effect of this peptide on vascular permeability may involve VE-Cadherin phosphorylation.

The mechanisms underlying endothelial detachment are poorly understood and to our knowledge have never been studied in TTP. Our results are consistent with mechanistic knowledge of modulation of adherens junction, with VE-cadherin phosphorylation being a consequence of type 1 endothelial activation. In quiescent vessels, VE-cadherin is in a dephosphorylated state. In this type of endothelial activation, the release of calcium and production of diacylglycerol leads to the activation of Protein Kinase C (PKC), which triggers VE-cadherin phosphorylation and internalization via Src kinase, resulting in the opening of the adherens junction opening[12,17,18]. VE-cadherin phosphorylation occurred for a short duration of stimulation (5 minutes), as expected for type 1 endothelial activation. It cannot be excluded that VE-cadherin is also degraded by matrix metalloproteinases, such as MMP-2, -7 or -9[19] or by clathrin-dependant endocytosis and lysosomal targeting by a mechanism involving p120[20].

Although TTP is not a disease with obvious clinical vascular hyperpermeability, it should be noted that more than half of the patients with acute changes on magnetic resonance imaging (MRI) of the brain showed signs of posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES)[21], a clinical-radiological entity associated with capillary leakage. In addition, patients with the atypical hemolytic uremic syndrome (another thrombotic microangiopathy with endothelial damage) may have extra-renal damages linked to abnormal vascular permeability (such as capillary leakage in the retina, swelling of the pancreas and mesentery), and these manifestations are often incorrectly attributed to fluid overload[22].

Interestingly, the IgG fraction from i-TTP patients reproduced the effects of plasmas on VE-cadherin. This result is consistent with previous work showing that IgG from i-TTP patients may contribute to endothelial degranulation[11]. This result raises questions that remain unanswered. First, to our knowledge, there are no data about IgG that induce a calcium-dependent activation of endothelial cells. Even if endothelial cells express Fc receptors (FcγIR and FcγIIR) that activate a Src kinase, it seems unlikely that Fc is responsible for EC activation, because a difference was observed between the IgG of i-TTP patients and that of the control patients. Further experiments are needed to precisely determine the signaling pathways. Second, the exact nature of these IgG is not known. Many studies have demonstrated the presence of Anti-Endothelial Cells antibodies (AECA) in plasmas from TTP patients. These antibodies have the property of inducing degranulation Weibel-Palade Bodies *in vitro*[23]. Although the target epitope is not always known, 2 studies reported a significant proportion of TTP patients with anti-CD36 antibodies, CD36 being an antigen on microvascular ECs but not macrovascular ECs. Interestingly, CD36 has been identified as the target antigen of

infected red blood cells in severe malaria, a disease that shares some pathophysiological aspects with TMA. In this disease, engagement of CD36 induced phosphorylation of Src family kinases, resulting in actin recruitment[24]. Nevertheless, the proportion of patients with AECA is controversial, and a substantial proportion of these antibodies are thought to be directed against the major histocompatibility complex (MHC)[25]. Indeed, it is known that in allogeneic kidney transplantation, donor-specific antibodies can trigger aggression of ECs, leading to acute or chronic humoral graft rejection with histological TMA features[26]. On the other hand, Ren *et al*. showed that the administration of xenogeneic AECA to rats resulted in dose-dependent and complement-mediated TMA features[27]. Our results are consistent with those Hernandez *et al*, who showed in 2012 that AECAs directed against endothelial cells induced intracellular calcium flux associated with VE-cadherin phosphorylation and increased permeability[28]. Antibodies are probably not the only ones responsible for cell detachment. Indeed, there are likely multiple mechanisms of injury: CEC may be greatly increased in other ischemic diseases, such as myocardial infarction and sickle cell disease[29]. Hypoxia is suspected to open the adherens junctions (except in the lung, where Annexin2 seems to prevent VE-cadherin phosphorylation) [30].

CECs are not only a biomarker but may also contribute to disease severity. Indeed, detachment of endothelial cells leads to exposure of the highly prothrombotic subendothelial matrix. In addition, CEC may exhibit an "activated phenotype" and intrinsic prothrombotic properties, as described in small vessel vasculitis and sickle cell disease[29]. Pharmacological inhibition of the mechanisms leading to endothelial cell detachment offers new therapeutic perspectives.

Our results may contribute to the understanding of the mechanisms behind the presence of elevated CECs in the blood of patients by linking endothelial activation to endothelial injury, which may indirectly exacerbate thrombotic events during TTP.

Conflict of Interest:

Pascale Poullin is a member of the scientific advisory boards of Ablynx-Sanofi. The other authors declare no competing financial interests.

References

1 George JN, Nester CM. Syndromes of thrombotic microangiopathy. N Engl J Med 2014; 371: 654–66.

2 Kremer Hovinga JA, Coppo P, Lämmle B, Moake JL, Miyata T, Vanhoorelbeke K. Thrombotic thrombocytopenic purpura. Nat Rev Dis Primers 2017; 3: 17020.

3 Goldberg RJ, Nakagawa T, Johnson RJ, Thurman JM. The role of endothelial cell injury in thrombotic microangiopathy. Am J Kidney Dis 2010; 56: 1168–74.

4 Motto D. Endothelial cells and thrombotic microangiopathy. Semin Nephrol 2012; 32: 208–14.

5 Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, Homeister J, Lamb CB, Desch KC, Zhang W, Tsai H-M, Wagner DD, Ginsburg D. Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. J Clin Invest 2005; 115: 2752–61.

6 Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. J Cell Mol Med 2009; 13: 454–71.

7 Lefevre P, George F, Durand JM, Sampol J. Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenic purpura. Thromb Haemost 1993; 69: 522.

8 Widemann A, Pasero C, Arnaud L, Poullin P, Loundou AD, Choukroun G, Sanderson F, Lacroix R, Sabatier F, Coppo P, Dignat-George F, Kaplanski G, ENDO-13 study group. Circulating endothelial cells and progenitors as prognostic factors during autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura: results of a prospective multicenter French study. J Thromb Haemost 2014; 12: 1601–9.

9 Erdbruegger U, Woywodt A, Kirsch T, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as a prognostic marker in thrombotic microangiopathy. Am J Kidney Dis 2006; 48: 564–70.

10 Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. Nat Rev Immunol 2007; 7: 803–15.

11 Tellier E, Widemann A, Cauchois R, Faccini J, Lagarde M, Brun M, Robert P, Robert S, Bachelier R, Poullin P, Roose E, Vanhoorelbeke K, Coppo P, Dignat-George F, Kaplanski G. Immune thrombotic thrombocytopenic purpura plasmas induce calcium- and IgG-dependent endothelial activation: correlations with disease severity. Haematologica 2022; .

12 Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB. Role of Ca2+ signaling in the regulation of endothelial permeability. Vascul Pharmacol 2002; 39: 173–85.

13 Woywodt A, Blann AD, Kirsch T, Erdbruegger U, Banzet N, Haubitz M, Dignat-George F. Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. J Thromb Haemost 2006; 4: 671–7.

14 Bertuglia S, Ichimura H, Fossati G, Parthasarathi K, Leoni F, Modena D, Cremonesi P, Bhattacharya J, Mascagni P. ITF1697, a stable Lys-Pro-containing peptide, inhibits weibel-palade body exocytosis induced by ischemia/reperfusion and pressure elevation. Mol Med 2007; 13: 615–24.

15 Yasuda K, Vasko R, Hayek P, Ratliff B, Bicer H, Mares J, Maruyama S, Bertuglia S, Mascagni P, Goligorsky MS. Functional consequences of inhibiting exocytosis of Weibel-Palade bodies in acute renal ischemia. Am J Physiol Renal Physiol 2012; 302: F713-721.

16 Miles AA, Miles EM. Vascular reactions to histamine, histamine-liberator and leukotaxine in the skin of guinea-pigs. J Physiol 1952; 118: 228–57.

17 Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. Dev Cell 2013; 26: 441–54.

18 Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. Biochim Biophys Acta 2008; 1778: 794–809.

19 Herren B, Levkau B, Raines EW, Ross R. Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. Mol Biol Cell 1998; 9: 1589–601.

20 Xiao K, Garner J, Buckley KM, Vincent PA, Chiasson CM, Dejana E, Faundez V, Kowalczyk AP. p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. Mol Biol Cell 2005; 16: 5141–51.

21 Burrus TM, Wijdicks EFM, Rabinstein AA. Brain lesions are most often reversible in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. Neurology 2009; 73: 66–70.

22 Tsai H-M. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: Beyond Hemolysis and Uremia. Am J Med 2019; 132: 161–7.

23 Praprotnik S, Blank M, Levy Y, Tavor S, Boffa MC, Weksler B, Eldor A, Shoenfeld Y. Anti-endothelial cell antibodies from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura specifically activate small vessel endothelial cells. Int Immunol 2001; 13: 203–10.

24 Davis SP, Amrein M, Gillrie MR, Lee K, Muruve DA, Ho M. Plasmodium falciparum-induced CD36 clustering rapidly strengthens cytoadherence via p130CAS-mediated actin cytoskeletal rearrangement. FASEB J 2012; 26: 1119–30.

25 Raife TJ, Atkinson B, Aster RH, McFarland JG, Gottschall JL. Minimal evidence of platelet and endothelial cell reactive antibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura. Am J Hematol 1999; 62: 82–7.

26 Drachenberg CB, Papadimitriou JC. Endothelial injury in renal antibody-mediated allograft rejection: a schematic view based on pathogenesis. Transplantation 2013; 95: 1073–83.

27 Ren G, Hack BK, Minto AW, Cunningham PN, Alexander JJ, Haas M, Quigg RJ. A complement-dependent model of thrombotic thrombocytopenic purpura induced by antibodies reactive with endothelial cells. Clin Immunol 2002; 103: 43–53.

28 Hernandez NM, Casselbrant A, Joshi M, Johansson BR, Sumitran-Holgersson S. Antibodies to kidney endothelial cells contribute to a “leaky” glomerular barrier in patients with chronic kidney diseases. Am J Physiol Renal Physiol 2012; 302: F884-894.

29 Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, Haubitz M, Hebbel RP, Lip GYH, Mancuso P, Sampol J, Solovey A, Dignat-George F. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. Thromb Haemost 2005; 93: 228–35.

30 Luo M, Flood EC, Almeida D, Yan L, Berlin DA, Heerdt PM, Hajjar KA. Annexin A2 supports pulmonary microvascular integrity by linking vascular endothelial cadherin and protein tyrosine phosphatases. J Exp Med 2017; 214: 2535–45.

2.3 Reviewing de l'article et complément de discussion

Suite à la soumission dans le journal *JTH,* des compléments d'information ou d'expériences ont été demandés par les reviewers. Ces expériences concernent les points suivants :

- La spécificité des effets liés aux IgG : nous réalisons des expériences de phosphorylation et d'internalisation de la VE-Cadhérine avec les fragments Fab'2 des IgG issus de patients PTTi vs patients contrôle, afin de définir si l'effet observé est Fc-dépendant ou pas. Les premiers résultats de nos expériences sont en faveur d'un effet de la fraction Fab'2.
- La nécessité d'une quantification directe de l'internalisation de la VE-Cadhérine, en complément de l'immunofluorescence.
- L'implication de la thrombine sur la phosphorylation de la VE-Cadhérine induite par les plasmas de patient PTTi. Les expériences de phosphorylation sont en cours de contrôle avec un inhibiteur de la thrombine (le PPACK).

Le PTT est une pathologie dont les manifestations cliniques sont essentiellement expliquées par l'ischémie et le syndrome anémique, et les patients n'ont en pratique clinique, pas de syndrome œdémateux. On pourrait ainsi supposer que les anomalies jonctionnelles constatées *in vitro*, et la majoration de la perméabilité constatée *in vivo* sont des épiphénomènes, voire des artefacts de laboratoire non applicables à l'humain. Cependant, une équipe canadienne a récemment montré une franche altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) au cours du PTT, qui ne s'améliorait que partiellement 6 mois plus tard.[346] L'implication de l'altération de la BHE étant bien établie dans la dépression et les troubles cognitifs,[347] on peut supposer qu'elle ait un rôle dans les séquelles cliniques neurologiques dont souffrent fréquemment les patients PTT.[131,135] Des travaux sont en cours pour étudier la corrélation entre les altérations morphologiques constatées et les anomalies cliniques séquellaires chez les patients de PTT. A l'heure actuelle, à notre connaissance nul ne sait si la majoration de perméabilité de la BHE est secondaire à l'ischémie locale ou à l'activation endothéliale qui peut conduire, nous l'avons vu, à une perte de l'intégrité vasculaire (Figure 38). A l'aune de ces éléments, on peut supposer qu'une inhibition pharmacologique de l'activation endothéliale puisse – en plus de limiter la libération des UL-vWF – limiter la majoration de la perméabilité constatée.

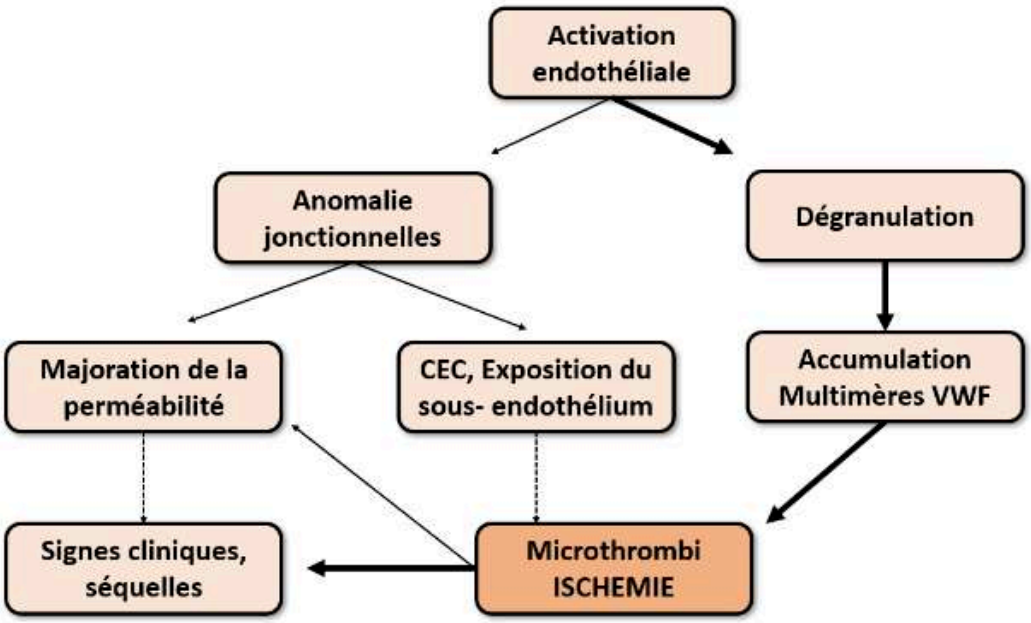


Figure 38: Proposition de schéma sur les conséquences des anomalies jonctionnelles endothéliales au cours du PTT (l'épaisseur des flèches est associée à notre degré de confiance dans les liens de causalité illustrés)

3. Inhibition de la dégranulation endothéliale au cours du PTT

3.1 Introduction

Nous avons vu dans notre introduction bibliographique que l'activation endothéliale est au cœur de la physiopathologie du PTT, notamment car elle conduit à la dégranulation des Corps de Weibel-Palade, et donc à la libération brutale de grands quantités d'UL-vWF. Notre équipe a récemment montré que cette dégranulation était dépendante d'un flux calcique intracellulaire (Annexe 2). L'intensité du flux calcique intracellulaire déclenché *in vitro* par les plasmas PTT est d'ailleurs associée à la sévérité clinique des malades dont sont issus les plasmas. Cette composante de la physiopathologie n'est pas spécifiquement ciblée par les traitements actuels.

L'ITF1697 est un tétrapeptide dérivé de la protéine C-réactive humaine* développé au début des années 2000 par la société milanaise Italfarmaco, dont la séquence est Glycine-(Nα-Et)Lysine-Proline-Arginine.[348,350] Ce peptide a la propriété d'inhiber la dégranulation endothéliale calcium-dépendante des CWP dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion[349] chez le hamster et dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë vasculaire chez la souris.[351] Ce peptide a pour effet i) l'inhibition de la libération du vWF par les cellules endothéliales, ii) la diminution de l'expression de P-sélectine par les cellules endothéliales, et iii) la diminution de la concentration du calcium cytosolique.[349] L'ITF1697 a par ailleurs fait preuve de son innocuité lors d'une étude de tolérance chez l'homme dans le syndrome coronaire aigu,[352] sans surrisque hémorragique.

Notre hypothèse est que le traitement par ITF-1697, en inhibant la dégranulation endothéliale, pourrait avoir un effet thérapeutique dans le PTT. Pour tester notre hypothèse nous avons procédé en deux étapes :

1. **Confirmer la fonctionnalité** de l'ITF1697 en tant **qu'inhibiteur du flux calcique intracellulaire et de la dégranulation endothéliale** *in vitro*, en utilisant des activateurs endothéliaux classiques et des plasmas issus de patients PTT.
2. **Tester l'ITF1697 *in vivo*** dans un modèle de PTT décrit dans la littérature. Dans ce modèle, le PTT est induit par injection de Shigatoxine à des souris KO ADAMTS13.

* C'est en 1987 qu'une équipe américaine[348] a constaté que des produits de dégradation de la protéine C-réactive humaine (CRP) possédaient une activité biologique similaire à celle de la Tuftsin, activité biologique portant notamment sur les capacités phagocytaires et le chimiotactisme. La tuftsin est un tétra-peptide de séquence Thr-Lys-Pro-Arg que l'on retrouve dans le fragment Fc des immunoglobulines. Les auteurs ont identifié 3 tétra-peptides contenant le motif Lys-Pro dans la séquence d'acide aminés de la CRP, dont un (Glycine – Lysine – Proline – Arginine) semblait le moins instable. Les peptides contenant une séquence Lys-Pro dans leur séquence ne sont pas extrêmement fréquents, on peut citer la Tuftsin, la région terminale l'αMSH, l'haptoglobine.[349] Au début des années 2000, la société Italfarmaco a stabilisé le peptide Gly-Lys-Pro-Arg en greffant un groupement éthyle sur l'azote alpha de la lysine afin d'améliorer la demi-vie de ce tétrapeptide (en le rendant moins sensible à la protéolyse endogène) et créant ainsi l'ITF1697, de formule Gly-(Nα-Et)Lys-Pro-Arg.

3.2 Matériels et méthodes

Plasmas de patients

Les plasmas sont obtenus à partir du premier échange plasmatique effectué en phase aiguë du PTTi (diagnostiqué selon les critères classiques de la pathologie : anémie hémolytique mécanique, thrombopénie, activité ADAMTS13 < 5% et présence d'auto-anticorps > 20UI/mL), avec le consentement éclairé des patients, selon les dispositions du PHRC national ENDO-13, entre 2008 et 2011 (#2007/23) approuvé par le comité d'éthique de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille. Les plasmas sont congelés directement après obtention et conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les plasmas contrôles sont également issus de séances d'échanges plasmatiques indiquées pour des pathologies auto-immunes mais sans tropisme vasculaire connu (notamment polyradiculonévrites et myasthénies auto-immunes).

Expérimentation *in vitro*

Culture cellulaire statique

Les cellules endothéliales macrovasculaires sont isolées à partir de veine de cordon ombilical humain frais (HUVEC) après accouchement à terme. 5 clones différents sont utilisés (K157, K164, K165, K171, HOX6). Les HUVEC sont cultivées à confluence sur des plaques recouvertes de gélatine 0.2%, maintenues à 37°C avec 5% de CO2 et 100% d'humidité, et dans du milieu complet EGM2 (Lonza), et sont utilisées dans nos expériences entre les passages 3 à 6.

Mesure du flux calcique intracellulaire

Les HUVEC à confluence dans une plaque 96 puits sont incubées pendant 1h en présence de la sonde fluo-4AM (ThermoFisher) diluée dans du PBS+/+ 1% BSA pour une concentration finale de sonde de 5µmol/L. Les cellules sont ensuite lavées par du PBS +/+ et incubées 30 min avec l'ITF1697 (dilué dans de l'EBM2 à la dose de 100µg/mL) en prétraitement ou avec de l'EMB2 seul. Les cellules sont enfin incubées avec 50µL par puit de PBS-BSA1% pour lecture de la fluorescence basale (GloMax® Multi Detection System, Promega), puis immédiatement stimulées avec différents activateurs (Thrombine 4UI/mL, VEGF 2ng/mL, plasmas PTT dilués au 1/100ème) +/- ITF1697 à 100µg/mL et une lecture immédiate de fluorescence est effectuée (1 lecture/min pendant 10 minutes pour chaque point). La fluorescence basale de chaque puit est retranchée aux valeurs post-stimulation.

Quantification des marqueurs de dégranulation endothéliale dans les surnageants

Les HUVEC à confluence dans des plaques 24 puits sont mises en condition de déprivation pendant 12h (EGM2 remplacé par EBM2-1%SVF) puis prétraitées ou non par de l'ITF1697 100µg/mL pendant 30 minutes. Elles sont ensuite activées par différents activateurs endothéliaux (Thrombine 4 UI/mL, TNFα 50 ng/mL, VEGF 2 ng/mL, histamine 100 µmol/L, plasmas de patients PTTi ou contrôles dilués au 1/100ème) pendant une heure (avec ou sans de l'ITF1697 à la dose de 100 µg/mL). Les surnageants sont récupérés, centrifugés 5 min à 300g et les surnageants récupérés pour analyse de l'endothéline-1 par ELISA.

Expérimentation animale

Conditions d'élevage

Des souris mâles et femelles ADAMTS13 KO (B6.129 ADAMTS13tm1Dgi) ont été élevées dans notre animalerie selon un cycle lumière/obscurité de 12 heures, avec libre accès à la nourriture et à l'eau. Au moment des expériences, les souris étaient âgées de 12 à 15 semaines et pesaient entre 18 et 26 g. Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux directives des *National Institutes of Health* et ont été approuvées par le comité d'éthique chargé de l'expérimentation animale de notre institution (APAFIS#30226-2021050614583963).

Protocoles expérimentaux

Le modèle murin de PTT induit par l'IL-1 β a été conduit chez des souris KO ADAMTS13 par des injections intrapéritonéales d'IL-1β recombinante humaine (10 ng/g de souris) toutes les heures pendant 10 heures, et plus ou moins traitées en même temps par ITF1697 (20µg/injection soit un total de 200µg). Différents modèles ont également été testés, nous avons notamment administré à des souris KO ADAMTS13 : de la Shigatoxine 1 et 2 (125, 250, 500, 1000 pg/g), de manière séquentielle (horaire ou quotidienne) ou continue grâce à des pompes micro-osmotiques ; du CpG (50 µg/souris) ; des histones H3 à 30 et 90 mg/g de souris ; de l'hème à 3.2 et 32 µg/kg et du LPS (50µg IP à J0-J1-J2).

Quantification des plaquettes

Après anesthésie des souris par Isoflurane 1% administré par aérosol, des échantillons de sang ont été prélevés soit dans la veine faciale (T0h), soit par une ponction intracardiaque (T10h) et recueillis dans des tubes EDTA. La quantification des plaquettes a été effectuée après dilution au 1/3000ème par analyse en cytométrie de flux (Cytoflex), et le reste du sang a été centrifugé à 1500g 15 minutes à température ambiante pour extraction du plasma. Les concentrations de D-dimères ont été déterminées par ELISA (Mouse D-2D, MyBio Source).

Histologie cardiaque

Après dislocation cervicale des souris, les cœurs frais ont été congelés dans de l'isopentane refroidi par l'azote liquide et inclus dans de l'OCT. Des coupes de 7µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat et montées sur des lames superfrost. Les lames ont ensuite été soit colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE), soit été utilisées pour réalisation des immunomarquages (anti-vWF (ab6994, Abcam, 20µg/mL), suivi par des anticorps secondaires conjugués à l'Alexafluor 488 (FABC8406S, Invitrogen, 2µg/mL) et DAPI avant d'être lues grâce au microscope Microsystem DMi8 (Leica). Les images ont été analysées avec le logiciel Image J. L'évaluation histologique de l'ischémie myocardique était basée sur une évaluation semi-quantitative à l'aide d'un score spécifique comprenant l'évaluation des 3 paramètres suivants sur une échelle de 0 à 3 : i) myocytolyse et vacuolisation des cardiomyocytes, ii) infiltrat inflammatoire de l'interstitium, et iii) les altération nucléaires (pycnose) ou absence de noyaux (Annexe 4). Dix coupes par cœur ont été analysées en aveugle du groupe de souris. L'évaluation histologique des microthrombi myocardiques était basée sur la quantification de l'intensité de l'immunomarquage du vWF dans les capillaires myocardiques. Dix coupes par cœur ont été analysées en aveugle. Pour chaque coupe, 3 fenêtres de taille uniforme ont été appliquées aux capillaires pour quantifier la fluorescence.

Analyses statistiques

Les graphes et tests statistiques ont été réalisés sur le logiciel Prism (GraphPad Software, Inc). Les valeurs sont présentées avec la médiane et interquartile. Nous avons utilisé le test de

Mann-Whitney non paramétrique (pour les résultats non appariés) et le rank-test de Wilcoxon non paramétrique (pour les résultats appariés) ; les tests étaient réalisés en bilatéral (two tailed). Une *P-valeur* <0.05 était considérée comme statistiquement significative.

3.3 Résultats

3.3.1 Résultats *in vitro*

L'ITF1697 inhibe le flux calcique induit par le VEGF, la thrombine et les plasmas issus de patients PTT

Pour tester la fonctionnalité du peptide ITF1697, nous avons d'abord testé son pouvoir inhibiteur du flux calcique induit par des activateurs classiques : le VEGF, l'histamine, la thrombine. La Figure 39 montre une augmentation significative du flux calcique pour chacun de ces activateurs, avec des intensités très différentes néanmoins puisque l'histamine provoque une augmentation de plus de deux fois supérieure à celles induites par le VEGF et la thrombine. Nous avons également stimulé les cellules avec des plasmas issus de patients PTTi en phase aiguë. Le prétraitement par ITF1697 à 100 µg/mL pendant 30 minutes a permis une réduction significative du flux calcique induit par le VEGF (48% d'inhibition après soustraction de la valeur induite par le milieu, $p < 0,05$), la thrombine (87% d'inhibition, $p<0,05$), mais pas par l'histamine (13% d'inhibition, non significatif). L'ITF1697 inhibe discrètement mais significativement le flux calcique induit par les plasmas PTT dilués au 1/100ème ($n = 10$, 17% d'inhibition, $p < 0.05$).

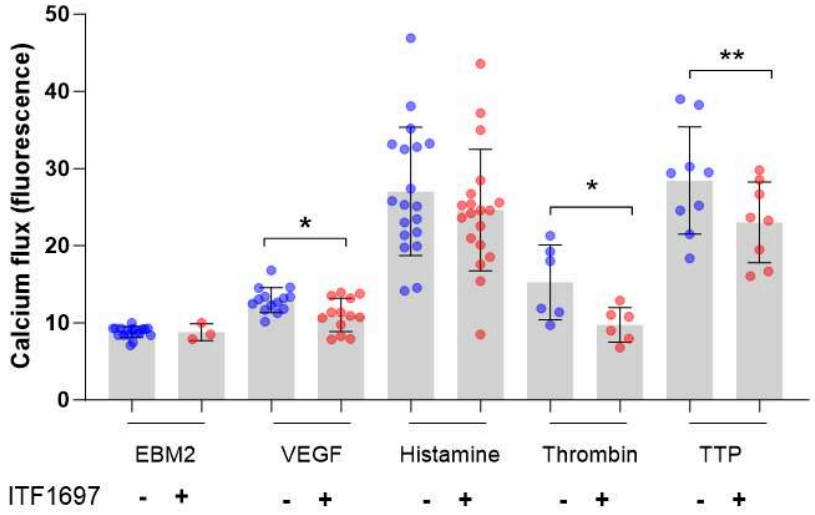


Figure 39: l'ITF1697 inhibe le flux calcique induit par le VEGF, la thrombine et les plasmas de patients PTT.

Le flux calcique intracellulaire est mesuré immédiatement après stimulation (+/- après prétraitement par ITF1697 pendant 30 min) des HUVEC à confluence par des plasmas au 1/100ème ($n = 8$, $p < 0,01$), du VEGF 2ng/mL ($p<0.05$), de l'histamine 100µM ou de la thrombine 4UI/mL ($p<0,05$)

Effet de l'ITF1697 sur la libération de l'endothéline-1 *in vitro*

L'activation endothéliale calcium-dépendante conduisant à une dégranulation des CWP, nous avons donc mesuré par ELISA l'endothéline-1 dans le surnageant des HUVEC activées pendant 1h par les plasmas PTT (dilués au 1/100ème), le VEGF et l'histamine et la thrombine, avec ou sans prétraitement par l'ITF1697 à 100µg/mL. En condition de culture statique, l'ITF1697 n'a pas montré de pouvoir inhibiteur de la dégranulation des CWP induite par les plasmas PTT dilués au 1/100ème (Figure 40, n=7). Des résultats préliminaires de dégranulation semblent en revanche prometteurs en condition de culture dynamique (en utilisant des chambres à flux), ils sont présentés en Annexe 5.

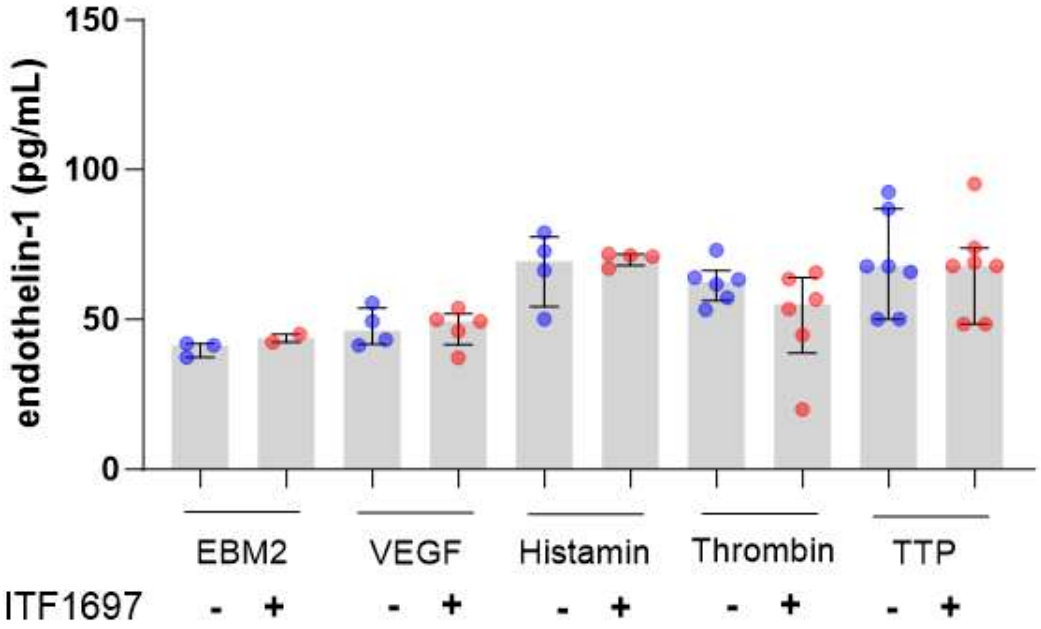


Figure 40: Effet de l'ITF1697 sur la libération de l'endothéline-1 en condition de culture statique.

Quantification de l'endothéline-1 par ELISA dans les surnageants cellulaires après activation des HUVEC à confluence pendant 1h par des plasmas de patients PTT dilués au 1/100ème (n=7), du VEGF 2ng/mL, de la thrombine 4 UI/mL ou de l'histamine 100 µM. Les cellules sont prétraitées ou non pendant 30 min par ITF1697 à 100µg/mL.

3.3.2 Résultats *in vivo*

3.1.2.1. Echecs du modèle « Shigatoxine » pour induire un PTT chez les souris

Nous avons voulu déclencher un PTT chez des souris invalidées pour le gène ADAMTS13 (obtenues en collaboration avec le Pr Karen Vanhoorelbeke) en administrant de la Shigatoxine 2, comme décrit par Motto *et al* dans le *Journal of Clinical Investigation* en 2005. Les souris devaient ensuite être traitées ou non par de l'ITF1697, administrées à l'aide de pompes micro-osmotiques Alzet implantées en sous-cutané (Figure 41).

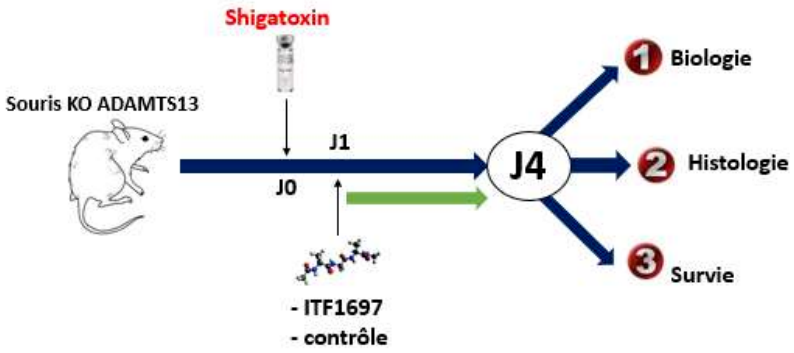


Figure 41: Projet initial d'induction du PTT chez les souris KO ADAMTS13

Nous n'avons pas réussi à reproduire ce modèle de PTT murin. Nous avons tenté de multiples adaptations de protocole pour « forcer » le phénotype de MAT.

- Nous avons **augmenté les doses de Shigatoxine** en multipliant la quantité administrée par un facteur 2, 10 et 100 : les souris présentaient (parfois) une discrète tendance à la thrombopénie, mais clairement pas un phénotype de PTT. Malgré une discrète augmentation de l'urée et de la créatininémie, nous n'avons pas déclenché une insuffisance rénale sévère chez les souris.
- Nous avons testé des injections uniques et des **injections répétées** (1 par heure pendant 8h par exemple) sans obtenir de thrombopénie
- Nous avons testé **différents modes d'administration :** injections intra-péritonéales, intraveineuse (rétro-orbitaire), et des administrations continues sous cutanées par des pompes micro-osmotiques.
- Nous avons **changé de Shigatoxine** (en passant de la Shigatoxine 2 à la Shigatoxine 1 et nous avons testé ces Shigatoxines sur les souris KO ADAMTS13 et sur les souris *wildtype*.

Ci-dessous est représenté un des résultats de dosages de plaquettes suite à une induction du PTT avec un protocole de Shigatoxine « renforcé », avec des injections de Shigatoxine 2 (125 pg/g de souris) toutes les heures pendant 8h (vs NaCl 0,9%) chez des souris

KO ADAMTS13 et des souris *Wildtype* (Figure 42). D'autres tentatives d'induction de PTT par de la Shigatoxine sont présentées en Annexe 6.

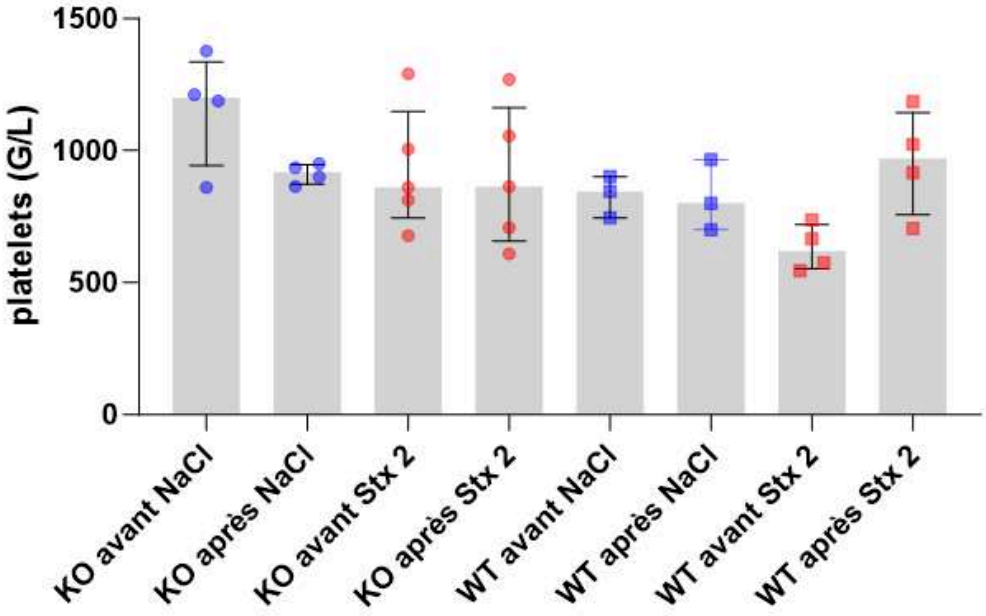


Figure 42: la Shigatoxine 2 à forte posologie n'a pas permis de déclencher un PTT

Quantification des plaquettes avant et après injection de Shigatoxine 2 (125 pg/g de souris/inj, à raison d'une injection par heure pendant 8 heures) ou de NaCl 0.9% chez des souris KO ADAMTS13 (n=5) ou WT (n=4)

3.1.2.2. Echecs de l'utilisation d'autres activateurs endothéliaux classiques

Afin de déclencher un PTT chez les souris KO pour ADAMTS13, nous avons testé d'autres activateurs endothéliaux connus et dont le rôle a été évoqué au cours du PTT, notamment des histones à 30 et 90 mg/g de souris, du CpG à 50 µg/souris et de l'hème à 3.2 et 32 µg/kg. Ces différents agonistes n'ont pas permis de déclencher une thrombopénie sévère chez les souris (Figure 43).

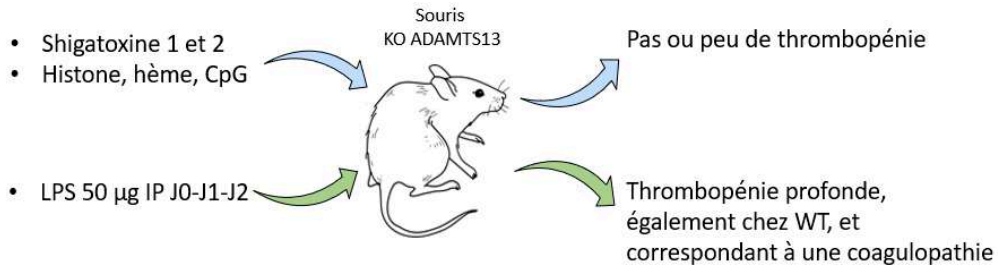


Figure 43: Echecs de différents activateurs pour déclencher un PTT chez les souris KO *ADAMTS13*

Seul le LPS a induit un tableau de thrombopénie profonde par un protocole d'injection de LPS 50µg en IP à J0-J1-J2 avec quantification des plaquettes à J3 (Figure 44). Cependant nous avons également constaté que :

- Le LPS induit une thrombopénie dose-dépendante également chez les souris WT, même si cette thrombopénie semblait un peu moins profonde que chez les souris KO-ADAMTS13
- Les taux de D-dimères sont très élevés chez les souris (KO et WT) qui ont reçu du LPS, ce qui témoigne d'une franche coagulopathie qui peut à elle seule expliquer la thrombopénie des souris (phénotype de CIVD)

La thrombopénie n'était pas corrigée par l'ITF1697 (administré par voie intrapéritonéale en continu à l'aide de pompes micro-osmotiques sous-cutanées), ni par un inhibiteur du TLR4 (le TAK242 à 3 mg/kg en IP).

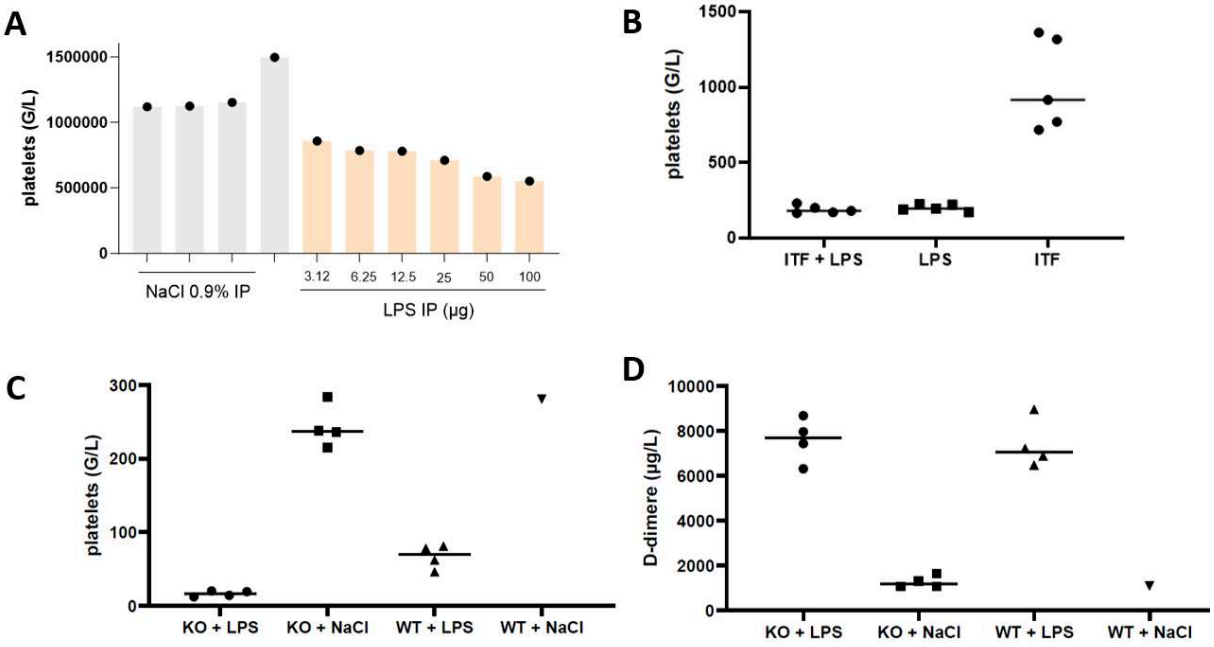


Figure 44: Le LPS induit une thrombopénie profonde chez les souris

(A) Administration de LPS IP (vs NaCl 0.9%) à des souris WT, dosage des plaquettes 1h après l'injection. (B) Administration de LPS IP (50µg J0-J1-J2) à des souris KO ADAMTS13 avec ou sans ITF1697 (200 µg/injection, en 2 injections par jour). Dosage des plaquettes 3h après la dernière injection. (C) et (D) Quantification des plaquettes des D-dimères 3h après la dernière injection de LPS IP (vs NaCl 0.9%) selon un protocole 50µg J0-J1-J2 administré à des souris KO ADAMTS13 vs des souris WT.

Devant ces résultats décevants, nous avons évidemment pris le temps de **génotyper les souris** par PCR afin de confirmer l'invalidation bi-allélique du gène *adamts13* (résultat présenté en Annexe 7).

2.1.2.2 Utilisation de l'IL-1 pour déclencher le PTT

En parallèle de ces tentatives infructueuses, le travail de thèse au C2VN de mon co-doctorant Romain Muller s'est intéressé à l'implication de l'IL1 (IL-1α et IL-1β) dans le PTT. Ces deux cytokines sont impliquées dans l'inflammation stérile qui est générée au cours du syndrome d'ischémie-reperfusion, et pourrait ainsi participer à aggraver les lésions d'organes en partie de manière TLR-dépendante.[353–358] Il a pu montrer un effet protecteur de l'Anakinra (la forme recombinante de l'antagoniste de l'IL-1R) sur les atteintes ischémiques (cardiaques et cérébrales) et sur la survie de souris KO pour ADAMTS13 dans lesquelles le PTT est déclenché par des injections répétées de vWF (*Muller et al, Blood, soumis et en révision*).

De manière inattendue, ce travail montre également que l'Anakinra améliore les paramètres hématologiques du PTT, suggérant que les IL-1 peuvent activer l'endothélium et donc libérer des multimères de vWF, illustrant le fait que les IL-1 sont au cœur d'une boucle d'amplification non décrite auparavant. Il a en effet montré que l'IL-1α et l'IL-1β induisent un flux calcique et une dégranulation endothéliale calcium-dépendante *in vitro* (Figure 45).

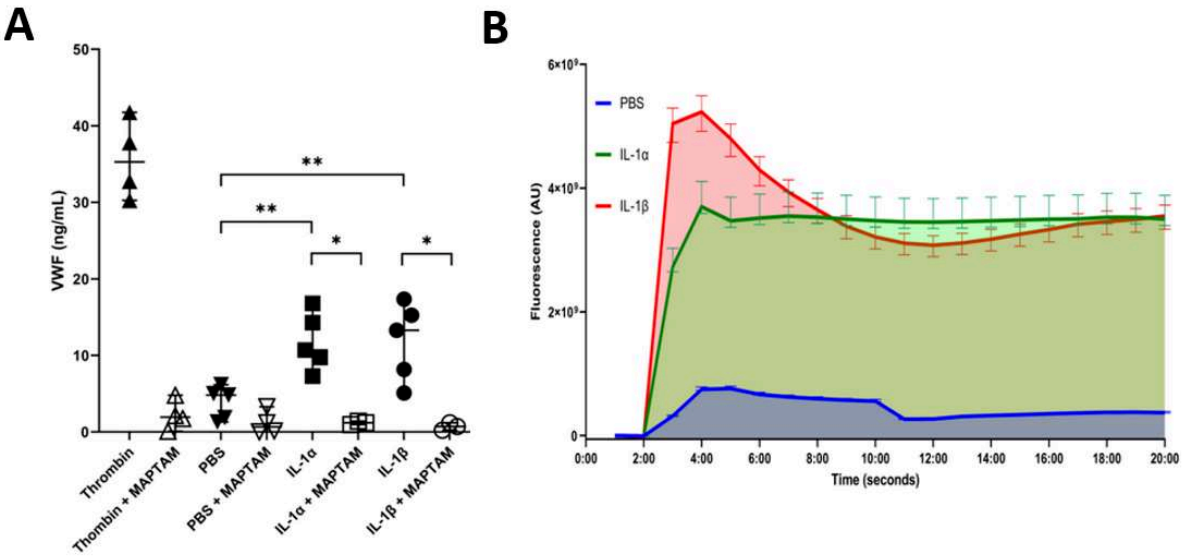


Figure 45: l'IL-1α et l'IL-1β induisent une dégranulation endothéliale calcium-dépendante (adapté de Muller et al, Blood, en révision)

(A) Concentration de vWF dans les surnageants des HUVEC après stimulation par IL-1α (10ng/mL), IL-1β (10ng/mL) et PBS +/- MAPTAM (1µmol/L). La thrombine (4 UI/mL) est utilisée comme contrôle positif. **(B)** Flux calcique intracellulaire après stimulation par IL-1α (10ng/mL), IL-1β (10 ng/mL) et PBS pendant 20 secondes.

Il montre également que l'administration de fortes doses d'IL-1α ou d'IL-1β (10 ng/g de souris toutes les heures pendant 9h) déclenche un PTT sévère chez des souris KO ADAMTS13 (Figure 46).

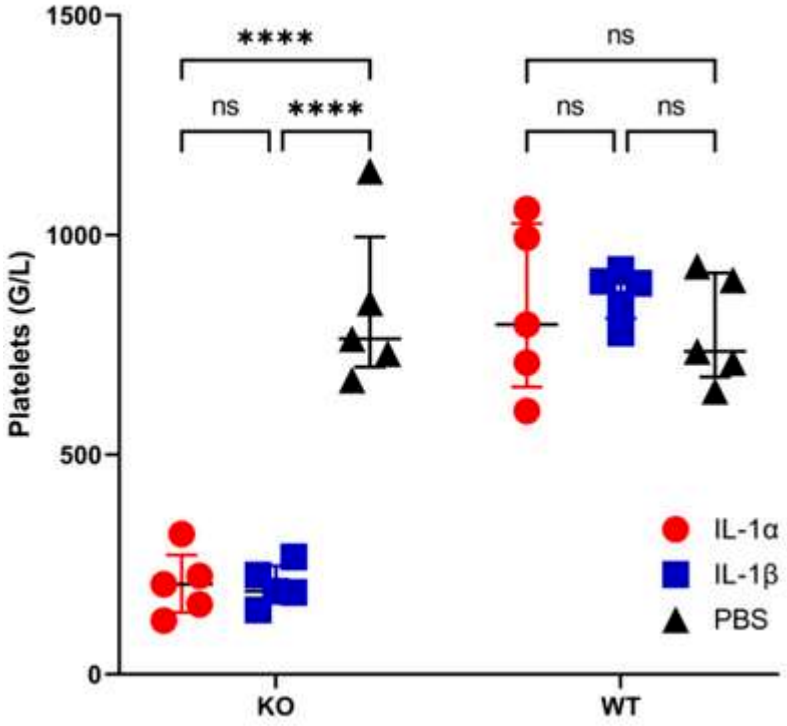


Figure 46: Les IL-1α et IL-1β induisent une thrombopénie profonde chez les souris KO ADAMTS13 (adapté de Muller et al, Blood, en révision)

Quantification des plaquettes à h10 chez des souris KO ADAMTS13 (KO) ou des souris WT qui ont reçu de l'IL-1α, de l'IL-1β ou du PBS (n=5 par groupe).

Ce modèle d'induction de la MAT pouvait donc devenir le modèle par lequel je pouvais tester un effet inhibiteur de l'ITF1697 *in vivo*. Ses résultats sont en cours de publication, et seront l'objet d'une soutenance de thèse prochainement.

Nous avons confirmé que l'injection de fortes doses d'IL-1β déclenchait une thrombopénie sévère chez les souris KO ADAMTS13 et des lésions myocardiques. Nous avons testé l'ITF1697 dans ce modèle mais n'avons pas pu montrer de bénéfice du tétrapeptide sur la thrombopénie (Figure 47).

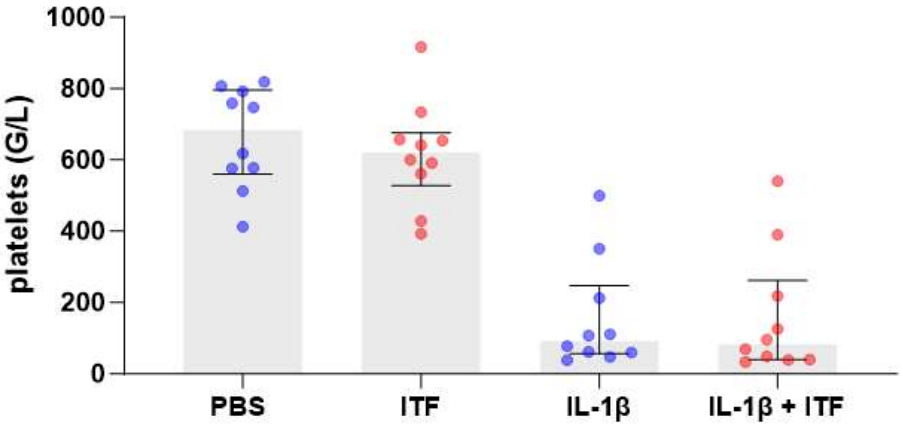


Figure 47: Absence d'effet de l'ITF1697 sur la thrombopénie induite par l'IL-1β in vivo.

Quantification des plaquettes chez les souris KO ADAMTS13 (n=10) ayant reçu 10 injections (1 injection par heure pendant 10h d'IL-1β à 10 ng/g de souris à chaque injection). Les souris étaient traitées ou non par ITF1697 (20µg par injection, 10 injections)

Nous avons extrait les cœurs des souris dont le PTT avait été induit par les injections d'IL-1β, et nous avons quantifié de manière semi-quantitative la sévérité de l'atteinte cardiaque ischémique selon le score histologique de sévérité mis en place au sein du laboratoire (détaillé en Annexe 4). De manière complémentaire, nous avons quantifié le vWF par immunofluorescence au niveau du myocarde. Nos résultats sont préliminaires (Figure 48) et laissent envisager un discret effet de l'ITF1697, qui doit être confirmé en incrémentant le nombre de souris et en étudiant dans ce modèle les marqueurs biologiques d'ischémie cardiaque, à savoir la troponine.

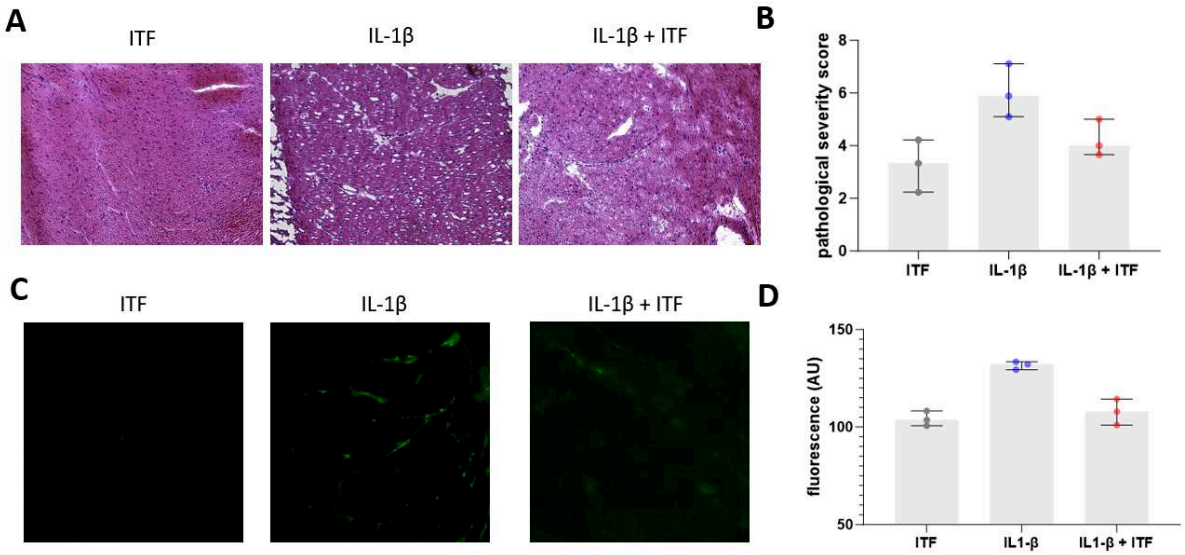


Figure 48: Analyse histologique des myocardes des souris ayant reçu de l'IL-1β

(A) myocarde de souris en coloration H/E et **(B)** Analyse semi-quantitative de la sévérité de l'ischémie myocardique (n=3, analyse de 10 coupes par cœur). **(C)** Quantification du vWF au niveau des tissus par immunofluorescence. **(D)** quantification de la fluorescence (n=3, 10 coupes par cœur).

3.4 Discussion des résultats

La dégranulation calcium dépendante des CWP est une composante majeure de la physiopathologie du PTT,[229] et n'est pas ciblée spécifiquement par les traitements actuels. Ainsi nous avons testé le tétrapeptide ITF1697, décrit dans la littérature comme un inhibiteur de la dégranulation des CWP, *in vitro* et *in vivo*.

Concernant nos résultats *in vitro*, l'ITF1697 a permis d'inhiber le flux calcique intracellulaire induit par la fixation de différentes molécules « activatrices » sur la cellule endothéliale, notamment la thrombine, et le VEGF, mais n'a pas permis d'inhiber significativement le flux calcique induit par l'histamine (malgré l'augmentation des doses d'ITF1697). Une des limites pour avancer dans la compréhension de nos résultats positifs et négatifs est que nous ne connaissons pas la cible moléculaire et le mécanisme d'action de l'ITF1697. La thrombine et l'histamine se fixent sur des récepteurs aux structures et propriétés très similaires (récepteurs à 7 domaines transmembranaires et couplés à une protéine G_q), mais le VEGF se fixe sur un récepteur à tyrosine kinase. Nos résultats suggèrent donc que l'ITF1697 agit au carrefour des voies de signalisation aboutissant à la libération de calcium par le réticulum endoplasmique (Src kinase, phospholipase, IP3 voire IP3-R qui est fixé sur le réticulum endoplasmique).[150] L'ITF1697 inhibe également modestement mais de manière statistiquement significative le flux calcique intense induit par les plasmas PTT. Il n'est pas certain que le niveau de cette inhibition soit biologiquement pertinent, car nous n'avons pas montré d'effet de l'ITF1697 sur la libération d'endothéline-1 par les CWP.

Pour expliquer ce manque d'effet observé sur la libération d'endothéline-1 malgré l'inhibition du flux calcique, nous avons émis plusieurs hypothèses. La première est que l'inhibition du flux calcique n'est pas suffisante (en termes d'intensité) pour inhiber la dégranulation des CWP induite par les plasmas PTT. Les résultats des analyses immuno-histologiques semblent montrer la présence de vWF dans les vaisseaux des cœurs de souris, mais un dosage ELISA du vWF dans les plasmas des souris doit être réalisé pour confirmer ces données. La deuxième hypothèse est que l'ITF1697 n'agit pas sur toutes les voies de signalisation induites par les divers activateurs contenus dans les plasmas de patients PTTi et aboutissant *in fine* à un flux calcique. La troisième hypothèse concerne les conditions de culture des cellules endothéliales : la culture statique des cellules endothéliales caractérisée par l'absence de flux unidirectionnel est éloignée des conditions physiologiques de croissance. Ceci modifie leur morphologie mais également leur comportement face à divers stimuli. Nos résultats en condition de culture dynamique (dont l'une des limites est la lourdeur technique) sont encourageants mais nécessitent d'être complétés et reproduits. Enfin, une quatrième hypothèse est que le modèle expérimental de cellules HUVEC n'est peut-être pas le plus adapté et que les expériences nécessiteraient probablement d'être reproduites sur des cellules issues de lignées microvasculaires. Il existe également probablement une variabilité entre les clones d'HUVEC.

Néanmoins, nous avons vu précédemment que l'ITF1697 semblait avoir une action *in vivo*, car il corrigeait la perméabilité induite par les plasmas PTT pour la ramener au niveau de celle induite par les plasmas contrôles. Nous avons donc décidé de poursuivre le projet en utilisant le peptide sur un modèle *in vivo* de PTT, utilisant des souris KO ADAMTS13. Comme nous l'avons vu, nous n'avons pas réussi à reproduire le modèle décrit dans la littérature d'induction du PTT par la Shigatoxine, sans avoir d'élément clair pour expliquer cet échec.

Plusieurs explications sont envisageables. Nous pouvons remettre en question notre modèle expérimental. Les souris nous ont été fournies par l'équipe du Pr Vanhoorelbeke, de l'université de Leuven (Belgique). Si nous n'avons pas de doute sur le fait que les souris aient une invalidation bi-allélique d'ADAMTS13 (nous l'avons confirmé par génotypage), nous n'avons pas la preuve formelle que les souris C57Bl6/129 aient bien été croisées deux fois avec le fond génétique Casa/Rk (CN2-/-), qui est le fond génétique ayant permis à Motto et al de déclencher le PTT, prouvant qu'il faut un niveau de fond suffisamment élevé de vWF pour déclencher la MAT. En outre, la Shigatoxine, bien qu'ayant montré une action cytotoxique *in vitro*, a pu être en partie dégradée et son potentiel d'inducteur diminué. Cette hypothèse est rendue moins plausible par le fait que la Shigatoxine a, à chaque fois, été commandée neuve (List Biological Laboratories). Nous avons d'ailleurs testé les Shigatoxine 1 et 2. La Shigatoxine 1 est connue pour déclencher davantage de flux calcique,[359] mais c'est la Shigatoxine 2 qui a été utilisée chez Motto et al, ce qui est cohérent avec le fait que la Shigatoxine 2 est responsable de l'essentiel des formes sévères des SHU à STEC chez l'enfant. Les majorations de dose et les différents protocoles et voies d'administration n'ont de plus pas permis de déclencher la MAT. Enfin un problème technique concernant les injections de Shigatoxine peut être évoqué, notamment lors de son administration par voie intraveineuse. Mais nous ne retenons pas cette hypothèse, compte tenu du fait que l'administration de vWF à 1500 UI/kg a immédiatement déclenché une thrombopénie très profonde (autour de 30 G/L). De plus, nous avions acquis l'expérience des injections intraveineuses rétro-orbitaires lors des expériences de Miles Assay, la preuve de l'injection IV étant immédiatement obtenue par une coloration des pattes des souris en une teinte bleutée.

C'est finalement de manière inattendue que nous avons pu déclencher le PTT chez les souris KO ADAMTS13, en utilisant de fortes doses d'IL-1β (des fortes doses d'IL-1α étant également possibles). Il est connu depuis longtemps que les IL-1 peuvent induire une activation endothéliale,[145] mais cet inducteur n'a, à notre connaissance, jamais été utilisé dans la littérature pour déclencher un PTT chez des souris. De plus, peu d'études se sont intéressées aux IL-1 au cours du PTT (on notera une étude japonaise parue en 1992 évoquant des taux d'IL-1β plus élevés chez les patients à l'admission que pendant la rémission). Nous pensons que les IL-1, si elles ne sont pas le « trigger » initial de la dégranulation endothéliale, s'inscrivent bien comme des boucles d'amplification de l'agression endothéliale, au même titre que la voie alterne du complément, que l'hème et que les nucléosomes. Si les quantités d'IL-1 utilisées pour déclencher le PTT chez les souris sont très élevées, nous avons quand même souhaité utiliser ce modèle pour tester notre peptide. Les résultats que nous avons obtenus sont en défaveur d'un effet protecteur de l'ITF1697 dans ce modèle.

Au total, les résultats *in vitro* et *in vivo* de l'ITF1697 s'avèrent décevants. Il semble que la bio-activité de ce peptide – qui n'a pas été avérée dans toutes nos expériences – soit insuffisante pour protéger les souris KO ADAMTS13 chez qui un PTT est déclenché par injection d'IL-1. Cependant, ces résultats avec l'ITF1697 ne remettent pas en cause le rationnel de cibler la dégranulation endothéliale dans le PTT, et d'autres inhibiteurs sont envisageables.

4. Travail réalisé au cours de la pandémie COVID-19

4.1 Contexte personnel

Cette thèse s'est en majeure partie déroulée durant la période pandémique de COVID19. En tant que médecin interniste, j'ai à 3 reprises participé activement au fonctionnement des unités COVID-19 à l'hôpital de la Conception, en tant que PHC. Malgré un intense afflux de malades, un épuisement des équipes et certaines situations difficiles « d'optimisation de l'allocation des ressources médicales », j'ai pu tirer de cette période des conséquences positives :

- sur le plan humain, ces épisodes ont renforcé les liens au sein de notre équipe médicale, et les liens avec les autres services. Le fonctionnement qui a été instauré à la Conception a été je crois particulièrement efficace : staff de tous les malades le matin (jusqu'à 52 en service conventionnel à la Conception), réunion quotidienne avec l'équipe locale de réanimation.

- sur le plan médical, il est très vite apparu que les formes sévères de COVID-19 étaient associés à des états hyperinflammatoires, auxquels je m'intéresse par le biais de ma spécialité en immunologie clinique, et un état d'immunothrombose avec dysfonction endothéliale majeure, thématique à laquelle j'étais évidemment sensibilisé grâce à mon intérêt concernant les MAT en général, et mon travail sur le PTT en particulier. Ainsi la prise en charge des malades atteints de formes sévères de COVID-19 m'a fait apprendre et progresser.

- sur le plan de la recherche, bien qu'ayant évidemment pénalisé mon travail sur le PTT, cette période a néanmoins été l'occasion de mettre à contribution ce que j'avais appris au cours de mon Master 2 et de ma Thèse de science débutante (gestion de base de données, statistique, écriture d'articles scientifiques) pour travailler sur la physiopathologie et les modalités thérapeutiques envisageable chez les patients les plus sévères.

4.2 Contexte scientifique

4.2.1 Introduction concernant le COVID-19

Le COVID-19, maladie qui résulte de l'infection de l'organisme par le coronavirus[*] **SARS-CoV-2** (Figure 49), est une pandémie qui a été particulièrement sévère de mars 2020 à juin 2022. Le premier cas hospitalisé a été décrit en Chine le 12 décembre 2019, et le génome du virus a été séquencé le 10 janvier 2020.[†] Le premier cas en France a été identifié le 24 janvier 2020, suivi 3 semaines plus tard du premier décès. Le 11 mars 2020, l'OMS déclarait la situation de pandémie, et le 17 mars 2020 la France amorçait un confinement inédit. La pandémie de COVID-19 a eu des conséquences majeures sanitaires (7 millions de décès dans le monde à la date du 18 août 2023), économiques (fermeture d'entreprises, perturbations dans les chaînes d'approvisionnement, pertes d'emplois…) et sociales.

Dans la majorité des cas (environ 80%, mais ce chiffre est très variable en fonction des variants), le COVID-19 est une affection bénigne. Toutefois, 10 à 15% des patients développent une pneumopathie, qui peut évoluer vers une forme sévèrement hypoxémiante appelée le **SDRA** (Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë), qui est un **état hyperinflammatoire pulmonaire** empêchant l'hématose,[‡] et qui est la **première cause de décès** au cours du COVID-19.[360] De plus, les études cliniques ont très rapidement rapporté l'augmentation d'incidence des **évènements thrombotiques veineux et artériels** chez les patients hospitalisés pour COVID-19.[361]

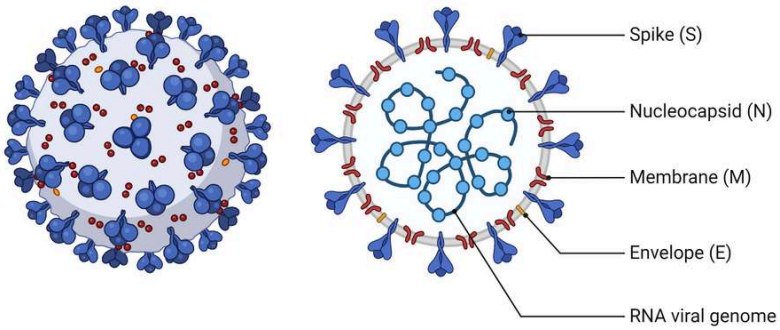


Figure 49: Structure du SARS-CoV-2

4.2.2 L'endothélium au cours du COVID-19

L'implication des cellules endothéliales a été rapidement évoquée[362–364] dans l'initiation et l'aggravation du SDRA et pour expliquer la fréquences des manifestations thrombotiques notamment par les conséquences de l'activation endothéliale que nous avons détaillées précédemment (altération de la barrière vasculaire, état procoagulant, inflammation vasculaire et infiltration leucocytaire) (Figure 50). Notons d'ailleurs que le

[*] 2 épidémies liées à des coronavirus, beaucoup moins sévères que celles liées au SARS-CoV-2, ont eu lieu par le passé : le SRAS, lié au SARS-CoV en 2003, et celle liée au MERS-CoV en 2012.

[†] Le SARS-CoV-2 est un virus à ARN monocaténaire enveloppé

[‡] Le rapport PaO2/FiO2 fait partie de la définition du SDRA, et permet de classer la sévérité

tropisme des coronavirus pour l'endothélium avait déjà été évoqué pour des précédents coronavirus.[365]

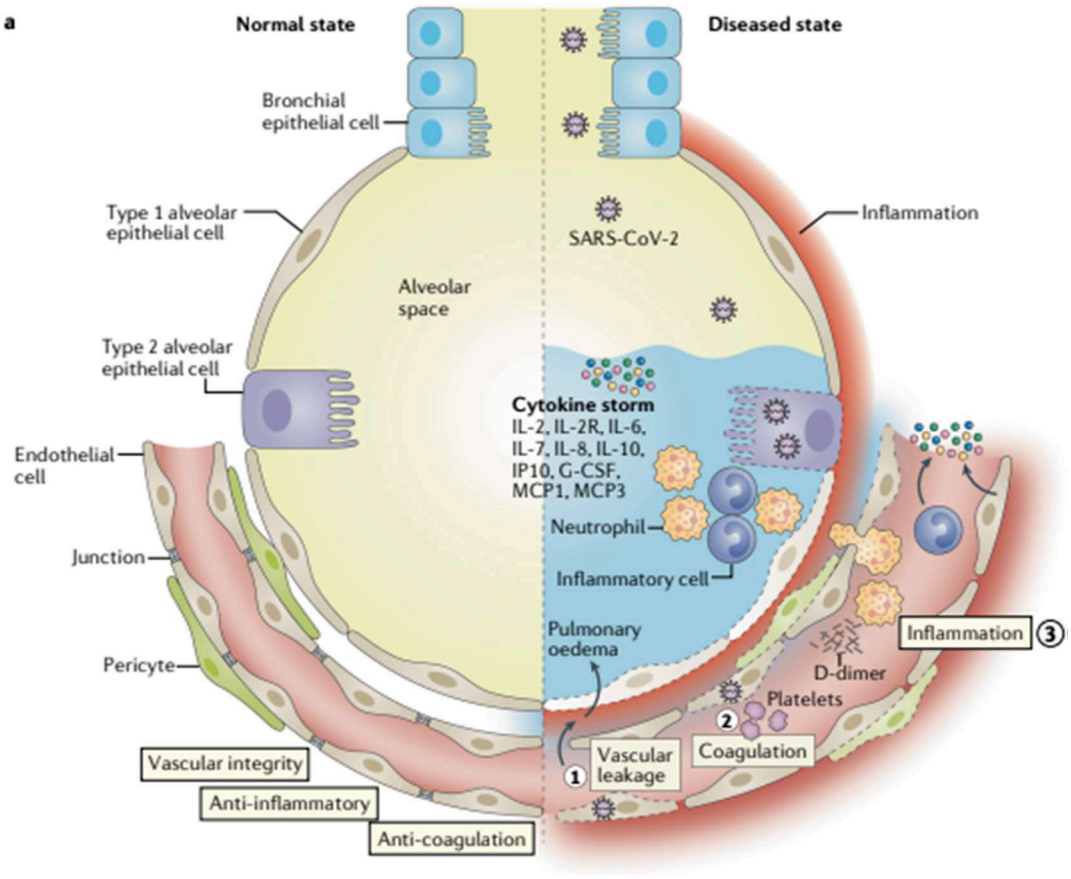


Figure 50: L'endothélium au cours du COVID-19 sévère (adapté de Teuwen *et al*[162])

4.2.2.1 Quels marqueurs d'agression endothéliale au cours du COVID-19 ?

Des analyses autopsiques ont mis en évidence des **lésions diffuses de souffrance endothéliale** et des microthrombi riches en fibrine et NETs[366] dans les poumons, les reins, le foie ou le système digestif.[363]

Des niveaux plus élevés de **P-sélectine soluble** (marqueur de l'activation endothéliale et plaquettaire) ont été observés chez les patients admis en soins intensifs (par rapports aux patients en hospitalisation conventionnelle), et des **taux élevés de thrombomoduline soluble** (marqueur libéré lors d'une lésion endothéliale) ont été associés à un risque accru de mortalité.[367] Il a également rapidement été montré qu'il y avait une **activation et une consommation du complément** (notamment de la voie alterne) au cours du COVID-19, et que cette activation était associée à un mauvais pronostic.[368,369]

Une équipe française a mis en évidence que les plasmas atteints de forme sévère de COVID-19 avaient un **effet cytotoxique rapide** (dès 1h d'incubation) sur les cellules

endothéliales en culture.[262] Ils rapportent également la corrélation entre les marqueurs de dysfonction endothéliale et la sévérité de pathologie (indépendamment de l'âge, du sexe et de l'indice de masse corporelle des patients).[370] Ils montrent de plus que les thrombi des patients (issus des circuits de circulation extracorporelle) sont riches en NETs mais également en vWF.

Par ailleurs, il a été montré que les patients atteints de COVID-19 avaient un **taux de CEC** qui était associé à la sévérité (et notamment à l'admission en unité de soins intensifs).[371] De plus les CEC étaient corrélés à sVCAM, un marqueur d'activation endothéliale. Comme nous l'avons vu précédemment, ces CEC sont des marqueurs d'agression endothéliale. Ce travail auquel nous avons participé est présenté en Annexe 8. L'augmentation des CEC au cours du COVID-19 a été confirmée par une équipe italienne (qui retrouvait également des taux augmentés de sVCAM et sICAM).[372]

4.2.2.2 Mécanismes à l'origine de l'hyperperméabilité vasculaire au cours du COVID-19

Plusieurs mécanismes participent à l'hyperperméabilité capillaire alvéolaire au cours du COVID-19 (Figure 51) :

- Une série autopsique a montré que le virus pouvait **directement infecter les cellules** endothéliales (et induire leur mort cellulaire).[364] Le récepteur ACE 2 (qui permet de lier la protéine Spike virale) est en effet présent sur les cellules endothéliales.[373]
- l'infection de la cellule endothéliale va également induire une internalisation de l'ACE2 et donc indirectement majorer la perméabilité régulée par le **système kallicréine-bradykinine**.[144]
- Le recrutement de PNN activés va induire une **génération d'espèces réactives de l'oxygène** qui sont toxiques pour l'endothélium.
- Les **cytokines inflammatoires** vont induire un phénotype endothélial activé qui entraîne une perte des jonctions inter-endothéliales. De plus les cytokines IL-1β et TNFα activent des glucuronidases qui dégradent le glycocalyx et activement la synthèse de la *Hyaluronic Acid synthase 2*, ce qui augmente la quantité d'acide hyaluronique dans la matrice extracellulaire et favorise la rétention fluidique locale.

Des études ciblant la perméabilité vasculaire au cours des COVID-19 sévères ont été publiées, avec des résultats mitigés.[*]

[*] Un essai randomisé ciblant l'angiopoïétine 2 n'a pas montré d'efficacité,[374] et un série rapporte une possible efficacité d'un anti-VEGF,[375] mais des essais contrôlés randomisés sont nécessaires.

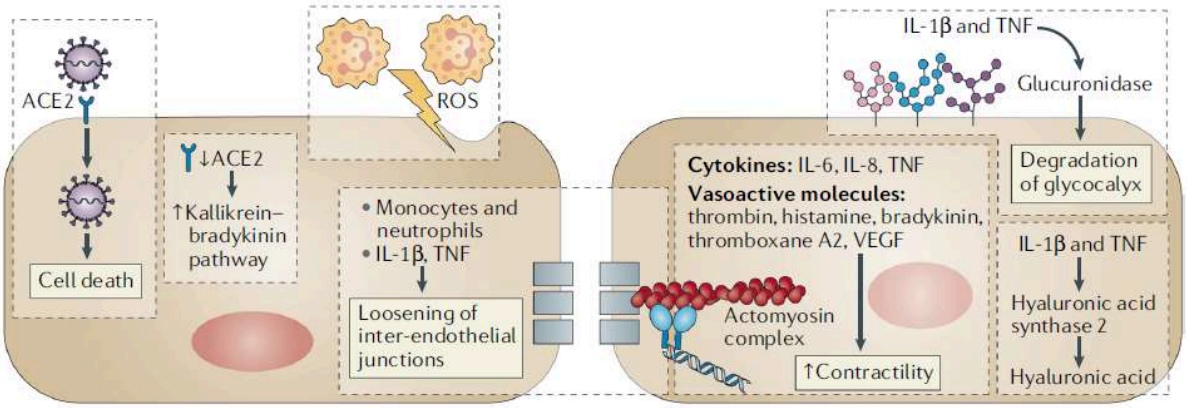


Figure 51: Mécanismes majorant la perméabilité endothéliale au cours du COVID-19 (Adapté de Teuwen *et al*[162])

4.2.2.3 Mécanismes à l'origine de l'état procoagulant

L'état prothrombotique présent au cours du COVID-19 a été rapidement identifié (Figure 52). Des taux augmentés de fibrine, de vWF, de D-dimères ont rapidement été mis en évidence.[*] Cette coagulopathie n'est pas associée à des anomalies du TP ou du TCA ni à une thrombopénie, il s'agit ainsi d'un tableau différent de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).[377] Différents mécanismes endothéliaux sont à l'origine de l'état procoagulant décrit au cours du COVID19 :

- **L'activation des cellules endothéliales** au cours du COVID-19 induit un état procoagulant et pro-agrégant.
- Le décollement des cellules endothéliales **expose la matrice sous endothéliale** qui est très prothrombotique.
- Nous avons participé à un travail[378] explorant les microvésicules chez 111 patients hospitalisés. Il est montré que les patients sévères (n = 38) et les patients avec complications thromboemboliques (n = 11) ont des taux de **microvésicules vectorisant le facteur tissulaire** (MV-TF+) plus important que les patients moins sévères ou sans complication thromboembolique.[†] Le taux de MV-TF+ est corrélé à des paramètres biologiques classiques de sévérité (D-dimères, Protéine C-réactive, Fibrinogène). De plus, la quantité de MV-TF+ est significativement supérieure chez les patients atteints de COVID-19 sévère comparée à des patients contrôles atteints de choc septique. Ce travail est présenté en Annexe 9.

Des éléments sont également en faveur d'une implication de l'activation plaquettaire dans la participation au phénotype prothrombotique.[380]

[*] Il a été suggéré que l'augmentation des taux circulant de vWF induisait une légère diminution de l'activité ADAMTS13 (par « consommation »).[376]

[†] La quantité de MV-TF+ était mesurée par un test fonctionnel (comme décrit dans Vallier *et al*, Thromb Res 2019[379]).

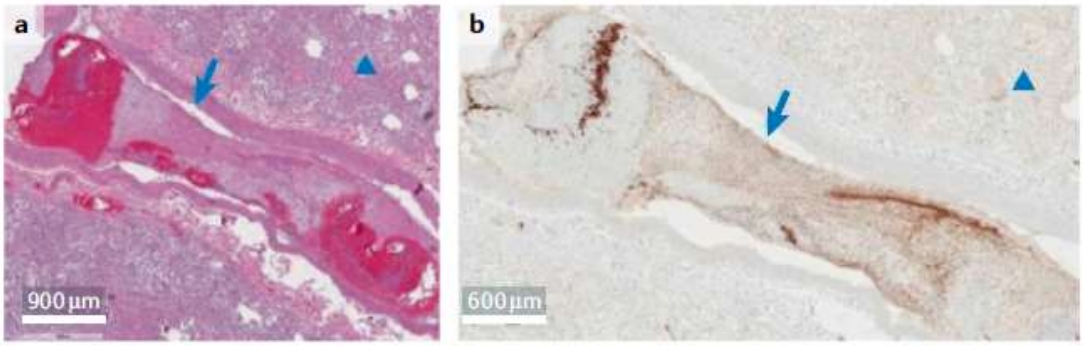


Figure 52: Thrombi dans une artériole et une veinule pulmonaire chez un patient atteint de COVID-19, image adaptée de Bonaventura *et al*, 2021[381] (a : coloration HE, b : immunomarquage CD61 pour cibler les plaquettes)

4.2.2.4 Participation de l'endothélium au phénotype inflammatoire

Concernant l'état pro-inflammatoire local, l'activation des cellules endothéliales participe au **recrutement leucocytaire** qui entretient l'inflammation locale. Les cellules endothéliales sont ainsi au cœur d'une boucle d'amplification, comme cela a par ailleurs été montré pour d'autres virus respiratoires, avec notamment un rôle du S1PR1 (*sphingosine 1 phosphate receptor 1*).[382]

De manière intéressante, il a été rapidement noté que les maladies cardio-vasculaires et facteurs de risque cardiovasculaire (diabète de type 2, HTA, obésité…) étaient associées à un risque de développer une forme sévère de COVID-19. L'hypothèse suivante a été émise : les **facteurs de risque cardiovasculaire** sont fortement associés à un phénotype de dysfonction endothéliale, qui comme nous l'avons vu est pro-inflammatoire et procoagulant et avec une tendance à l'hyperperméabilité. Il existe ainsi chez ces patients possiblement une propension à initier un syndrome hyperinflammatoire pulmonaire en cas d'infection virale.

4.2.3 Le COVID-19, un modèle d'immunothrombose

4.2.3.1 Qu'est-ce que l'immunothrombose ?

Le terme d'immunothrombose a été proposé en 2013 par Engelmann et Massberg, et désigne les multiples interactions entre l'immunité innée et l'hémostase conduisant à la formation de thrombus, notamment dans la microcirculation.[383] Ce concept a d'abord été utilisé pour décrire la place des phénomènes thrombotiques pour limiter la propagation des agents infectieux.

L'immunothrombose implique différents acteurs cellulaires, vésiculaires et protéiques en étroite interrelation (Figure 53) :

- **L'endothélium activé**, qui est prothrombotique et permet de recruter les effecteurs myéloïdes (PNN et monocytes).
- **Les monocytes**, qui peuvent activer la coagulation en exprimant le facteur tissulaire*. Les **microvésicules** monocytaires générées sont prothrombotiques.
- **Les PNN, qui peuvent générer des NETs** qui ont plusieurs effets prothrombotiques : i) ils vectorisent du facteur tissulaire (activant la voie extrinsèque) et du facteur XII (activant la voie intrinsèque), ii) ils lient le vWF et donc participent à recruter les plaquettes, iii) les histones H3 et H4 activent les plaquettes et enfin iv) la neutrophil elastase et la myélopéroxydase inhibent des molécules antithrombotiques endogènes (tels que le TFPA et la thrombomoduline)
- **Les plaquettes activées**, qui elles-mêmes génèrent des microvésicules
- Le système du **complément**, nous avons détaillé précédemment certains aspects qui font que l'activation du complément (notamment de la voie alterne) a des conséquences prothrombotiques. On pourrait rajouter à la Figure 53 un effet direct du complément (notamment du C5a et C5b9) sur les cellules endothéliales.
- Les cytokines pro-inflammatoires, notamment **les interleukine-1 et donc de l'inflammasome NLRP3**.[384]

* Le facteur tissulaire (également appelé facteur III, ou thromboplastine) est une glycoprotéine appartenant à la superfamille des récepteurs cytokiniques. C'est une protéine à l'interface des voies de la coagulation et de l'inflammation. Il est exprimé par les cellules musculaires lisses et l'adventice, et est sous forme encryptée sur les cellules en contact direct avec le sang circulant (cellules endothéliales et certains leucocytes). L'expression du FT peut rapidement être up-régulée et il peut être décrypté à la faveur de stimuli divers (IL-1b, ROS…).

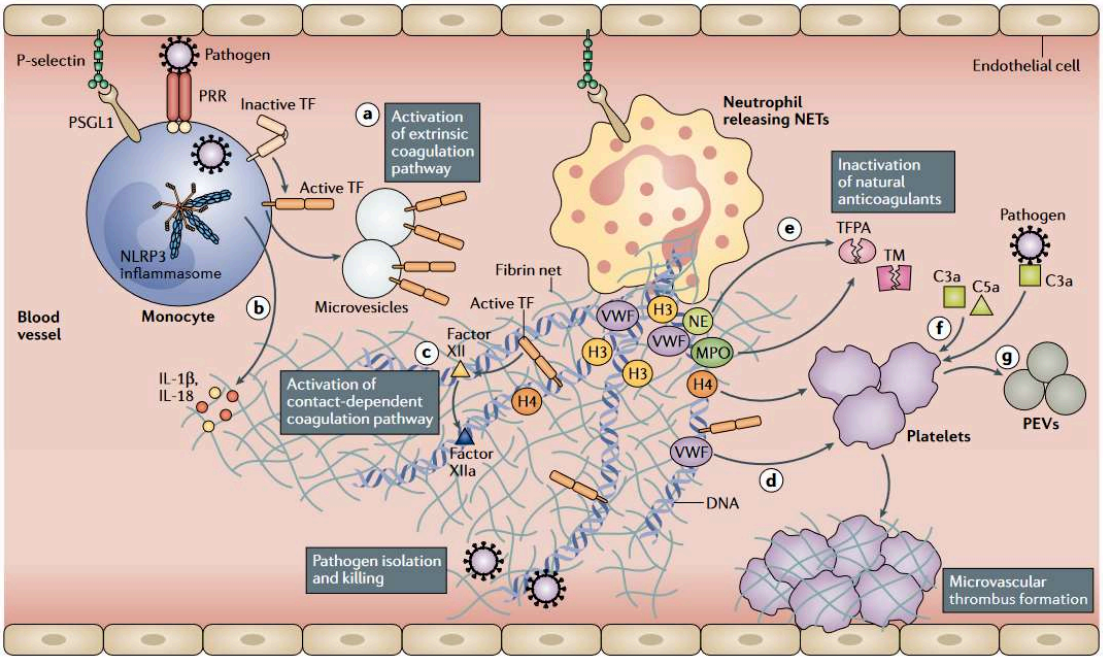


Figure 53: Les différents acteurs de l'immunothrombose (cellules endothéliales, monocytes, PNN & NETs, plaquettes, microvésicules, protéines du complément et cytokines). Adapté de Bonaventura *et al*, Nature Reviews Immunology, 2021.[381]

4.2.3.2 Implication des Interleukine-1 au cours de l'immunothrombose

4.2.3.2.1 Les IL-1α et IL-1β

La **famille des interleukine-1** est constituée de 11 cytokines* (Figure 54) qui se fixent à des récepteurs constitués de 3 domaines Ig-like extracellulaires et un domaine TIR intracellulaire.[385] La fixation des cytokines induit une hétéro-dimérisation des récepteurs ce qui permet à **Myd88** d'interagir avec le domaine TIR et donc *in fine* de permettre l'activation du facteur de transcription **NF-κB** (par la voie canonique ou non canonique). NF-κB va alors induire la transcription de nombreux gènes qui auront des conséquences pro-inflammatoires (cytokines, COX2…), de polarisation de la réponse inflammatoire notamment vers une orientation Th17, de stimulation de l'hématopoïèse myéloïde, pro-angiogénique, et de remodelage de la matrice extracellulaire.[386]

* 7 cytokines ont un rôle pro-inflammatoire (IL-1α, IL-1β, IL-18, IL-33, IL-36α, β et γ) et 4 ont un rôle anti-inflammatoire (IL-1RA, IL-36RA, IL-37 et IL-38)

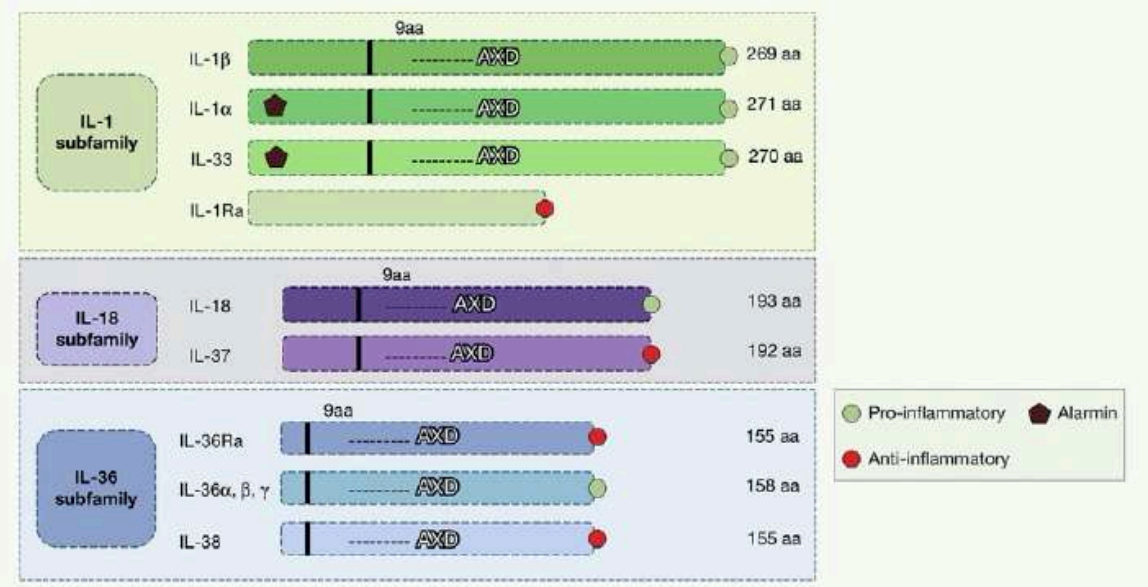


Figure 54: la famille des IL-1, avec les sous-familles IL-1, IL-18 et IL-36 (adapté de Mantovani *et al*, 2019)

L'IL-1β est essentiellement produite par les monocytes et macrophages, par activation de l'inflammasome, la caspase 1 clivant la pro-IL-1β (31 kDa) en IL-1β (17 kDa). L'IL-1β est l'une des cytokines majeures de la réponse inflammatoire, et qui était connue auparavant sous le nom de pyrogène endogène. L'activation de l'IL-1β nécessite un clivage protéolytique par un complexe nommé inflammasome (Figure 55).

L'inflammasome est un complexe macromoléculaire constitué d'un récepteur (qui donne son nom à l'inflammasome, ex : NLRP3, pyrine…), la protéine ASC et la procaspase 1[*]. L'activation de l'inflammasome se fait en 2 étapes[†] :

1. **Le « priming »** : activation de la voie NF-κB par différents signaux possibles notamment des DAMPs/PAMPs sur des PRR (notamment les Toll-Like récepteurs), le C3a et le C5a, les IL-1α et IL-1β. Ceci aboutit à la transcription puis à la traduction de la procaspase 1, de NLRP3, de la Gasdermine, et des pro-IL-1β et pro-IL-18[‡]
2. **Le « triggering »** : divers second signaux (influx calcique, efflux potassique, cristaux d'urate de sodium) peuvent spécifiquement activer NLRP3[§], puis l'assemblage et l'oligomérisation du complexe NLRP3-ASC-Procaspase 1. La caspase 1 activée va ainsi :

[*] On parle également d'inflammasomes non canoniques pour certains complexes susceptibles de cliver la pro-IL-1β sans recours à la caspase 1 (ex : caspase 11 chez la souris et possiblement la caspase 8 chez l'homme).

[†] Ces 2 étapes constituent ainsi 2 modalités différentes d'up-régulation de la voie IL-1β (transcriptomique et protéolytiques).

[‡] Notons que l'IL-1β ne possède pas de peptide signal au niveau N-terminal, ce qui fait que sa sécrétion n'est pas médiée par les voies habituelles d'exocytose. Il semble exister des mécanismes de libération inflammasome-dépendant et des mécanismes inflammasome-indépendants : on décrit parfois graduellement i) l'inhibition de l'autophagie, ii) la libération de d'exosomes et de microvésicules ou l'inhibition de l'autophagie et iii) la libération de l'IL-1β par les pores de Gasdermine voire au stade maximal sa libération via la pyroptose

[§] D'autres signaux, par exemple bactériens, peuvent activer l'inflammasome NLRC4 ou NLRP1.

- **Cliver les pro-IL-1 β et pro-IL-18 en cytokines actives**[*]
- Cliver la Gasdermine D qui va s'oligomériser à la surface membranaire et former un pore qui laisse entrer l'eau et le Na^+, ce qui peut entraîner la mort inflammatoire de la cellule (la **pyroptose**).[†]

A l'inverse, **l'IL-1α** est contenue de manière constitutive par les cellules épithéliales, les cellules endothéliales[‡], et globalement dans les cellules mésenchymateuses de l'humain, mais elle est également présente de manière inductible dans les cellules myéloïdes. Il s'agit d'une cytokine qui est libérée lors de la mort cellulaire, et agit essentiellement localement, en fonctionnant comme une alarmine ou DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns). Par ailleurs l'IL-1α possède une séquence de localisation nucléaire et pourrait ainsi agir comme un facteur de transcription.

Il existe une **forme recombinante de l'antagoniste du récepteur des IL-1α et IL-1β** (IL-1RA[§]) : l'Anakinra, commercialisé sous le nom de Kineret®. Ce médicament a l'AMM dans la goutte, la maladie de Still et les cryopyrinopathies.

4.2.3.2.1 L'activation de l'inflammasome NLRP3 induit un phénotype prothrombotique par différents mécanismes

En plus de l'activation des pro-IL1β et pro-IL-18 en cytokines actives, l'activation de l'inflammasome NLRP3 va directement et indirectement avoir des conséquences thrombotiques. Elle va en effet favoriser la **libération de microvésicules monocytaires** vectorisant le facteur tissulaire[388] et **l'externalisation de la phosphatidylsérine** (PS). La PS participe à décrypter le facteur tissulaire.[389,390] Les PNN contiennent également l'inflammasome NLRP3, et si les PNN n'entrent habituellement pas dans un processus de pyroptose, l'activation de NLRP3 peut conduire à la formation de NETs.[391,392] L'IL-1 β (comme d'autres cytokines) induit **l'expression du facteur tissulaire** sur les monocytes.[393] Enfin, **la thrombine joue un rôle amplificateur**, car en plus d'être l'enzyme clé de la coagulation, elle agit comme activateur plaquettaire et boucle d'amplification en activant les PARs de cellules immunitaires recrutées et stimulées par les cytokines inflammatoires produites.

[*] D'autres protéases peuvent activer la pro-IL-1β en cytokine active dans le milieu extracellulaire (par exemple la protéinase 3, la neutrophil-elastase, MMP-9, la cathepsine G. Il s'agit vraisemblablement d'un mécanisme minoritaire d'activation de la pro-IL-1β

[†] A la différence de l'apoptose, il existe une intégrité nucléaire au cours de la pyr

[‡] Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que les cellules endothéliales pouvaient, en condition de stress, libérer des corps apoptotiques contenant de l'IL-1α.[387]

[§] IL-1Ra est le seul membre directement actif dans la famille des IL-1. Il circule sous forme soluble, et occupe le site de liaison de l'IL-1R1. Notons que l'IL-1R2 est un récepteur « leurre » sans domaine TIR cytoplasmique et donc incapable d'initier la voie NF-κB.

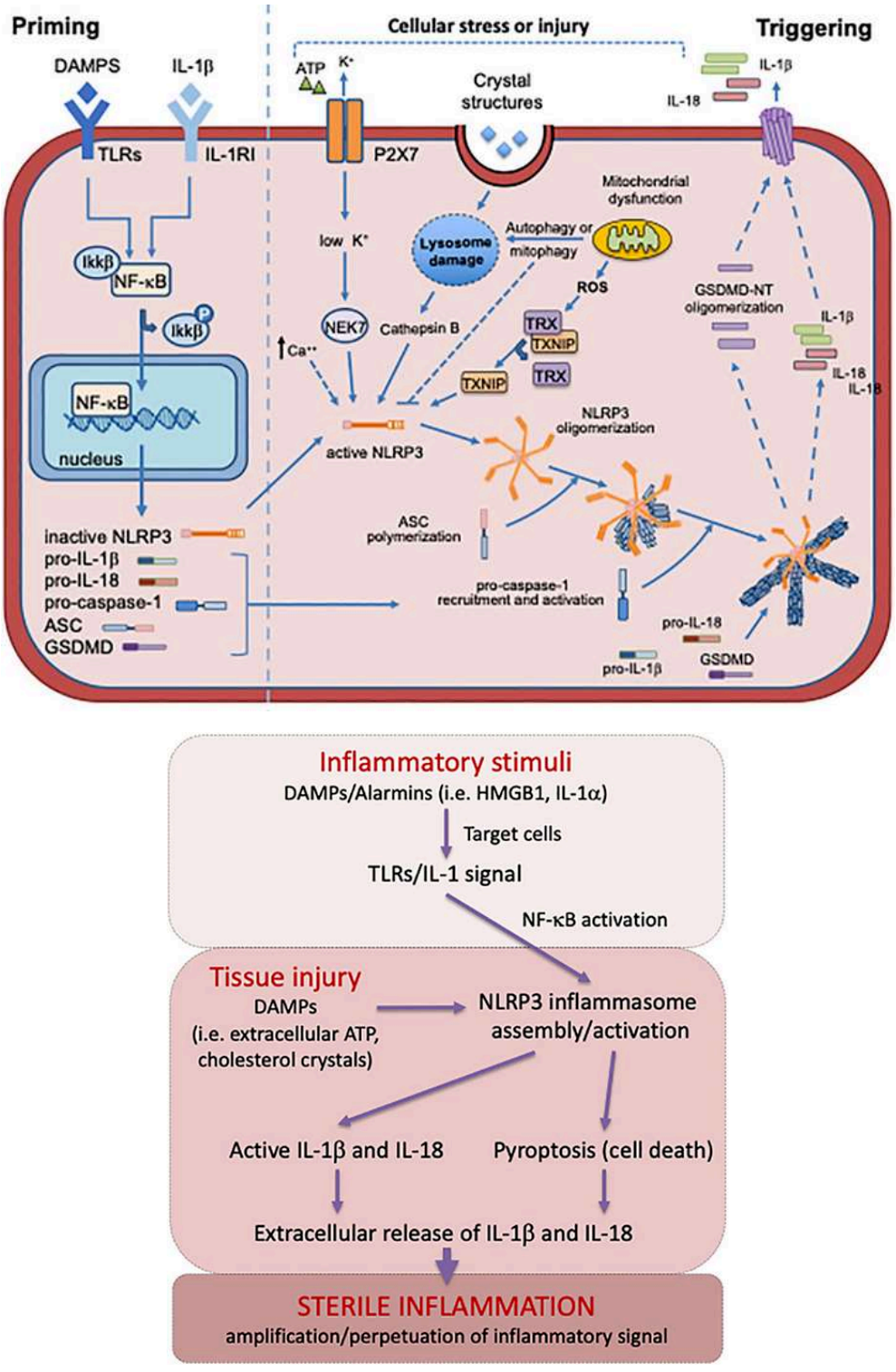


Figure 55: Priming et activation de l'inflammasome NLRP3 (adapté de Toldo, Abbate *et al*, 2021[394])

4.2.3.3 Implication de l'axe inflammasome-IL-1β au cours du COVID-19

4.2.3.3.1 Signes en faveur d'une implication de l'inflammasome

Il a rapidement été mis en évidence que les patients présentant un SDRA avaient des taux très élevés (dans la circulation mais surtout dans les LBA)[395] de cytokines telles que l'IL-1β, IL-6, IL-18.[396,397] Le SARS-CoV-2 active l'inflammasome NLRP3 monocytaire *in vitro*. Des taux élevés d'IL-1β et d'IL-18 sont associés à un mauvais pronostic chez les patients.[398] L'augmentation majeure de la ferritine, plus rare dans le COVID-19, est également un facteur associé à mauvais pronostic, et qui témoigne d'une implication de l'axe IL-18-IFNγ.[399] En lien avec ce que nous avons décrit sur l'implication de l'endothélium au cours de la pathologie, on notera que les cellules endothéliales sont directement activables par les cytokines IL1-β , IL-6 et TNFα.[400]

Ces éléments suggèrent qu'une réponse inflammatoire excessive (au moins en partie dépendante de l'axe NLRP3-IL-1β) participe à la sévérité du SDRA chez les patients atteints de forme sévère de COVID-19.

4.2.3.3.2 Mécanisme d'activation de l'inflammasome

Il a été montré que le SARS-CoV-2 induit une activation de l'axe IL-1β/IL-6 plus importante que les autres coronavirus,[401] avec une implication de l'inflammasome NLRP3.[398]

Comme pour d'autres infections respiratoires, l'inflammasome peut être activé de manière indirecte au cours du COVID-19 via les alarmines. Le virus peut initialement échapper à la première défense antivirale car il semble qu'il induise une diminution de la réponse interféron de type 1[*].[403]Ainsi, le virus se multiplie massivement au cours du temps, et peut induire des lésions de l'épithélium pulmonaire avec relargage d'IL-1α, qui va jouer son rôle l'alarmine et activer les macrophages résidents, qui vont eux-mêmes recruter et activer les monocytes. Le complément (notamment l'anaphylatoxine C5a) pourrait également favoriser le priming de l'inflammasome.

Plus spécifiquement, il semble que la glycoprotéine virale ORF3a du SARS-CoV-2 puisse former des pores favorisant un stress ionique dans les monocytes (pouvant ainsi servir de « signal n°2 » aboutissant au l'activation protéolytique de l'IL-1β). La glycoprotéine E pourrait induire un flux calcique issu de l'appareil de Golgi, et favoriser l'activation de l'inflammasome. D'autres viroprotéines, telles que ORF8b, peuvent directement activer NLRP3 en liant le domaine LRR.[404]

Le relargage massif d'IL-1β amorce une boucle de rétrocontrôle positif car elle induit une hyperactivation monocytaire et stimule sa propre synthèse, activation et relargage au sein du poumon (Figure 56). L'IL-1β va participer à activer les cellules endothéliales, avec les conséquences pro-inflammatoires, pro-perméabilité et procoagulantes que nous avons vu

[*] Il a par ailleurs été montré que les patients les plus sévères avaient plus souvent des auto-anticorps anti interféron de type 1.[402]

précédemment. Ainsi s'amorce l'orage cytokinique pulmonaire, cet état hyperinflammatoire local qui conduit à un tableau de SDRA.

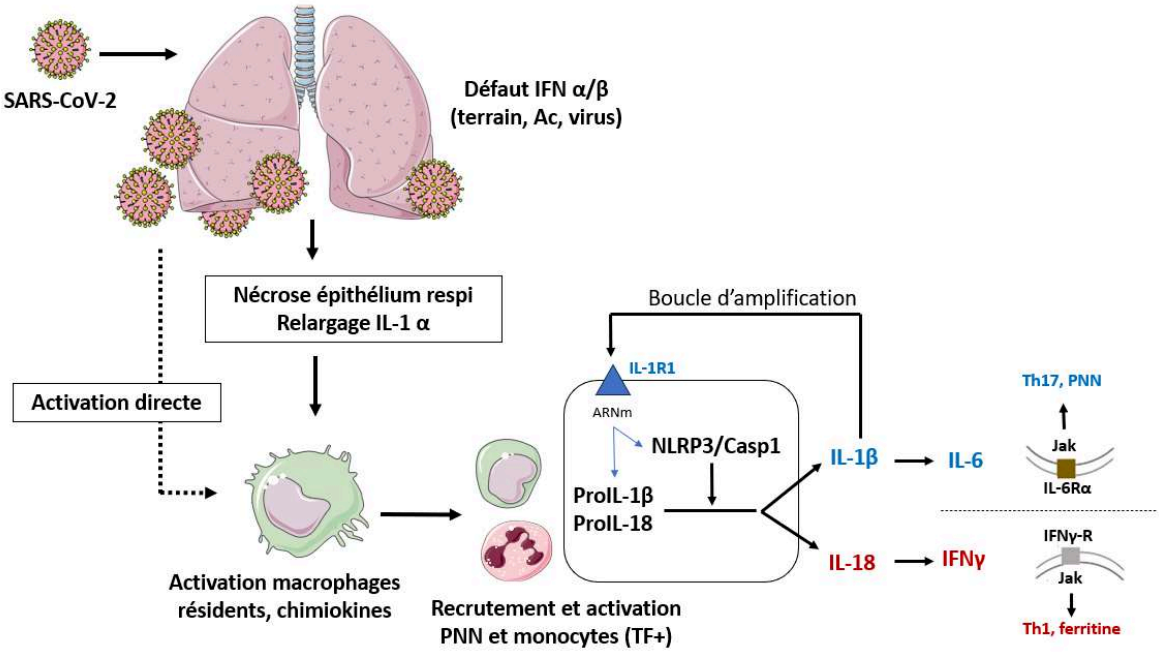


Figure 56: Activation de l'inflammasome au cours du COVID-19, proposition de synthèse

4.2.4 La nécessité de traitements et de biomarqueurs prédictifs des formes sévères

4.2.4.1 Quels traitements pour le COVID-19 en mars 2020 ?

Au début de la pandémie (moment où les antiviraux et les anticorps monoclonaux n'étaient pas déployés), la prise en charge des patients sans comorbidité atteints de formes modérées à sévère de COVID-19 associait :

- Une **oxygénothérapie**, adaptée à l'oxygénorequérance, dont le débit était piloté sur la saturation percutanée. Régulièrement, de l'oxygène à haut débit administré par voie nasale (HFNO, Optiflow) était nécessaire. Si les premières recommandations suggéraient d'intégrer la fréquence respiratoire pour piloter le débit d'oxygénothérapie, il est vite apparu que malgré une atteinte sévère et une désaturation profonde, les patients pouvaient garder une mécanique ventilatoire faussement rassurante.

- Une **prophylaxie antithrombotique « renforcée »** compte tenu de la fréquence des complications thrombotiques veineuses, et dans une moindre mesure artérielle. Dès le 03 avril 2020, le GFHT et le GIHT ont fait des propositions pragmatiques et opérantes pour les doses d'héparine à utiliser. Pour les patients hospitalisés hors réanimation, la dose était fonction i) de l'indice de masse corporelle, ii) de l'intensité du syndrome inflammatoire biologique et iii) du taux de D-dimères (les auteurs proposaient une anticoagulation curative lorsque le fibrinogène était supérieur à 8 g/L ou les D-dimères > 3 µg/mL).

- Pour les formes sévères, la nécessité **d'un traitement anti-inflammatoire** s'est vite imposée, car il s'avérait qu'après une phase virale survenait une phase « inflammatoire » (Figure 57). Les questions suivantes se sont rapidement posées : quelle molécule ? A quelle dose ? A quel moment de la maladie ?

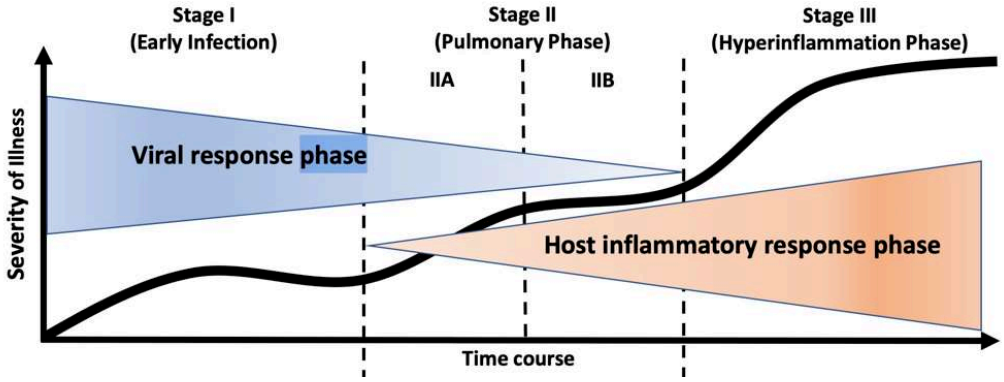


Figure 57: Une phase "inflammatoire" a été évoquée depuis le début de la pandémie (adapté de Siddiqi *et al*[405]).

Comme nous l'avons vu, il est vite apparu que les IL-1 participaient activement à l'apparition de l'état hyperinflammatoire pulmonaire des patients les plus sévères. C'est donc assez naturellement que plusieurs équipes, dont la nôtre, ont fait **l'hypothèse que l'Anakinra contribuerait au traitement des patients qui étaient manifestement en train d'amorcer une phase inflammatoire de la maladie.** Nous présentons les résultats de ce travail dans la partie 4.3.

4.2.4.2 Comment identifier les patients à risque ?

Devant l'afflux considérable de malades qui a eu lieu au début de la pandémie, la question d'identifier les patients qui sont à risque d'évoluer défavorablement s'est posée. Au cours des réunions matinales quotidiennes durant les premières vagues épidémiques à SARS-CoV-2, nous avons rapidement identifié une caractéristique inattendue des patients hospitalisés pour COVID-19 : certains avaient une éosinopénie profonde (0 G/L),[*] et il nous semblait que les patients avec l'éosinopénie la plus profonde évoluaient plus fréquemment vers des formes sévères. **Notre hypothèse a été que l'éosinopénie profonde puisse servir de biomarqueur pronostic pour les patients hospitalisés pour COVID-19**. Pour confirmer – ou infirmer – cette impression clinique, nous avons initié un large recueil de données permettant l'analyse des paramètres biologiques à l'arrivée de 551 patients et leur évolution clinique. Les résultats de ce travail sont présentés dans la partie 4.4.

[*] Cet élément avait déjà été constaté, de manière assez confidentielle, lors des épidémies de SRAS et MERS-CoV.

4.3 Article original (PNAS, 2020)

4.2.1 Introduction

Comme nous l'avons vu, les IL-1 (et notamment l'IL-1β) sont impliquées dans la physiopathologie du COVID-19. Les signatures cytokiniques des patients sont plutôt en faveur d'un profil IL-1/IL6 même s'ils peuvent évoluer vers un profil IL-18/IFNγ, avec d'authentiques syndromes d'activation macrophagiques (SAM). L'Anakinra est la forme recombinante de l'antagoniste de l'IL-1R et bloque l'action de l'IL-1α et de l'IL-1β (il a en effet une affinité élevée pour l'IL-1R1 supérieures à celles des IL-1),[406] mais il a également montré son efficacité quand il a été administré à forte dose dans des SAM.[407]

Nous avons donc mené une des premières études rétrospectives évaluant l'efficacité de l'Anakinra au cours de formes modérées de COVID-19, à risque de forme sévère (patients hospitalisés en unité COVID-19 conventionnelle). Les patients ayant bénéficié de l'Anakinra (n=12) avaient des signes de dégradation clinique rapide (majoration de l'oxygénorequérance > 4L/min en 12h) et un syndrome inflammatoire biologique (qui était évalué sur la CRP). Des patients pris en charge à Avignon avec des caractéristiques cliniques et biologiques communes ont servi de groupe contrôle (n=10). Les caractéristiques des patients sont présentées Figure 58. La posologie administrée d'Anakinra était élevée (300 mg/j en IVSE sur 2h pendant 5 jours, avec décroissance progressive sur 3 jours). Les patients ont été suivis pendant 20 jours. On notera que cette étude a été menée avant la publication de l'étude RECOVERY, qui a montré un bénéfice de la Dexaméthasone chez les patients atteints de forme sévère de la maladie.

	Anakinra (n = 12)	Control (n = 10)	*P* value
Demographics			
Male / Female, n (%)	6 (50%) / 6 (50%)	6 (60%) / 4 (40%)	0.69
Age (years), Median [IQR]	61 [54-68]	58 [45-69]	0.61
BMI (kg/m²), Median [IQR]	25.3 [24.6-30.9]	27.2 [26.2-28.9]	0.96
Comorbidity, n (%)			
- High Blood Pressure	4 (33.3%)	3 (30%)	0.99
- Cardiovascular disease	1 (8.3%)	2 (20%)	0.57
- Diabetes	0 (0%)	3 (30%)	0.08
- Chronic Respiratory disease	2 (16.7%)	4 (40%)	0.35
- Tobacco smoking	3 (25%)	1 (10%)	0.63
- Chronic kidney disease	0 (0%)	1 (10%)	0.45
Clinical and Paraclinical parameters at Day 1			
- Temperature (°C), Median [IQR]	38.2 [37.6-38.5]	38.7 [37.9-39.5]	0.09
- NEWS score (severity), Median [IQR]	8 [7.25-9]	7.5 [5.75-10.25]	0.46
- CRP (mg/L), Median [IQR]	162 [122-212]	147 [130-251]	0.58
- Ferritin (µg/L), Median [IQR]	1797 [972-3119]	1165 [1019-3706]	0.87
- CT-scan severity, Median [IQR]	3 [2-3]	3 [2-3]	0.84
- Patients with invasive ventilation at Day 1, n (%)	2 (17%)	2 (20%)	0.99

Figure 58 : caractéristique des patients (figure non présente dans l'article original)

Nous avons pu montrer que les patients du groupe Anakinra avaient un score de sévérité NEWS (qui était en usage au début de la pandémie) à J5 après l'initiation du traitement qui était significativement inférieur à celui du groupe contrôle (4.5[2-5] vs 8 [6.5-11.25], p<0.05, Figure 59). Ils avaient une durée réduite d'oxygénorequérance > 3L (p<0.05).

Nous avons remarqué une tendance à une durée moindre sous ventilation mécanique, mais nous avons probablement manqué de puissance (p<0.06).

	Anakinra (n = 12)	Control (n = 10)	*P* value
Outcomes (20 days follow-up)			
- NEWS score (severity) at Day 5, Median [IQR]	4.5 [2-5]	8 [6.5-11.25]	< 0.01
- Number of days with O_2 < 3L/min, Median [IQR]	15.5 [13.25-17.5]	8 [0 - 15]	< 0.05
- Number of ICU free days, Median [IQR]	17.5 [16.25-20]	14 [9.5-20]	0.17
- Number of Invasive ventilation free days, Median [IQR]	20 [20-20]	17 [9.5-20]	0.06
- Death, n (%)	0 (0%)	1 (10%)	0.45

Figure 59: Critères de jugement de notre étude rétrospective

4.3.2 L'article original

Nous présentons ci-dessous l'article original, puis nous aborderons quelques points de discussion, notamment sur les études ultérieures qui ont évalué l'impact de l'Anakinra dans le COVID-19.

Early IL-1 receptor blockade in severe inflammatory respiratory failure complicating COVID-19

Raphaël Cauchois[a,1], Marie Koubi[a,1], David Delarbre[b], Cécile Manet[c], Julien Carvelli[d], Valery Benjamin Blasco[e], Rodolphe Jean[a], Louis Fouche[f], Charleric Bornet[g], Vanessa Pauly[h], Karin Mazodier[a], Vincent Pestre[c], Pierre-André Jarrot[a], Charles A. Dinarello[i,2], and Gilles Kaplanski[a,2]

[a]Division of Clinical Immunology, Aix-Marseille Université, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, 13005 Marseille, France; [b]Division of Internal Medicine, L'hôpital d'Instruction des Armées Sainte Anne, 83000 Toulon, France; [c]Division of Internal Medicine, Centre Hospitalier Henri Duffaut, 84000 Avignon, France; [d]Réanimation des Urgences, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, 13005 Marseille, France; [e]Réanimation Polyvalente des Pathologies du Foie, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, 13005 Marseille, France; [f]Réanimation des Brûlés, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, 13005 Marseille, France; [g]Pharmacy, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, 13005 Marseille, France; [h]Department of Medical Information, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, 13005 Marseille, France; and [i]Department of Medicine, University of Colorado, Aurora, CO 80045

Edited by Philippa Marrack, National Jewish Health, Denver, CO, and approved July 15, 2020 (received for review May 11, 2020)

Around the tenth day after diagnosis, ∼20% of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19)–associated pneumonia evolve toward severe oxygen dependence (stage 2b) and acute respiratory distress syndrome (stage 3) associated with systemic inflammation often termed a "cytokine storm." Because interleukin-1 (IL-1) blocks the production of IL-6 and other proinflammatory cytokines, we treated COVID-19 patients early in the disease with the IL-1 receptor antagonist, anakinra. We retrospectively compared 22 patients from three different centers in France with stages 2b and 3 COVID-19–associated pneumonia presenting with acute severe respiratory failure and systemic inflammation who received either standard-of-care treatment alone (10 patients) or combined with intravenous anakinra (12 patients). Treatment started at 300 mg·d^{-1} for 5 d, then tapered with lower dosing over 3 d. Both populations were comparable for age, comorbidities, clinical stage, and elevated biomarkers of systemic inflammation. All of the patients treated with anakinra improved clinically ($P < 0.01$), with no deaths, significant decreases in oxygen requirements ($P < 0.05$), and more days without invasive mechanical ventilation ($P < 0.06$), compared with the control group. The effect of anakinra was rapid, as judged by significant decrease of fever and C-reactive protein at day 3. A mean total dose of 1,950 mg was infused with no adverse side effects or bacterial infection. We conclude that early blockade of the IL-1 receptor is therapeutic in acute hyperinflammatory respiratory failure in COVID-19 patients.

interleukin-1 | COVID-19 | anakinra | pneumonia

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)–associated disease, can be classified into three clinical stages. In stage 1, an estimated 80 to 84% of infected patients are slightly symptomatic. In stage 2a, patients have a nonhypoxemic pneumonia but can advance to a hypoxemic pneumonia (stage 2b) or acute respiratory distress syndrome in stage 3 (1, 2). After ∼9 d to 10 d, 17 to 20% of patients can evolve toward more severe stages 2b or 3, with increasing requirement for oxygen necessitating admission into intensive care units (ICU) with noninvasive or invasive mechanical ventilation (IMV) (1, 2). This progression of the disease is associated with high levels of circulating proinflammatory cytokines, often termed a "cytokine storm" (3).

SARS-CoV-2 activates the NLRP3 inflammasome, resulting in the processing and secretion of active IL-1β and IL-18 and the initiation of a cytokine release syndrome (4, 5). IL-1β induces IL-6 and a Th-17 immune response (5), whereas IL-18 induces IFN gamma (IFNγ) production by Th-1 lymphocytes (6). An IL-1/IL-6 signature increases neutrophils and C-reactive protein (CRP), whereas an IL-18/IFNγ signature is characterized by hyperferritinemia and cytopenia (7). A majority of patients with COVID-19 exhibit a predominant IL-1/IL-6 signature, but can evolve into an IL-18/IFNγ signature mimicking cytokine profiles observed in other inflammatory diseases such as macrophage activation syndrome (MAS) (8). Anakinra is highly effective in MAS (8) and significantly decreased all-cause mortality (9). We thus hypothesized that blocking IL-1 early using anakinra is a therapeutic option in patients with severe stage 2b and early stage 3 COVID-19.

Patients and Results

Study Design and Patients. This study was approved (INDS, MR4115050520) by the Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille for compassionate use; participants receiving anakinra gave written informed consent. COVID-19 pneumonia was diagnosed in patients with a positive PCR for SARS-CoV-2 in nasopharyngeal samples, respiratory symptoms, and a concordant pneumonia on low-dose computed tomography (CT) scan, scored from 0 to 5 according to the severity (10). Between the 5th and 13th days of the diagnosis, the patients presented severe hypoxia requiring oxygen therapy and were classified as stage 2b or 3, according to the 2020 clinical staging proposal (2). Anakinra was started with a rapidly deteriorating condition consisting of increased oxygen requirement of >4 L/min within the previous 12 h, and CRP above 110 mg/L with or without fever higher than 38.5 °C.

A control group of patients were selected among 30 patients seen in Avignon and Toulon to closely match the inclusion criteria for treatment with anakinra (Dataset S1). The control group standard of care included antibiotics and hydroxychloroquine, and two patients in Avignon received ritonavir/lopinovir. Anakinra-treated patients received no antivirals. Day 1 (Fig. 1) corresponds to anakinra initiation and the day the control group fulfilled the inclusion criteria defined for the anakinra group. Anakinra (Swedish Orphan Biovitrum) was infused intravenously (i.v.) over 2 h as a single daily dose of 300 mg for 5 d, then tapered to 200 mg·d^{-1} for 2 d, and then 100 mg for 1 d. Also at this time, all patients but one had at least one negative PCR test for SARS-CoV-2 in nasopharyngeal samples. Patients' clinical outcome

Author contributions: C.A.D. and G.K. designed research; R.C., M.K., D.D., C.M., J.C., V.B.B., R.J., L.F., C.B., K.M., V. Pestre, P.-A.J., and G.K. performed research; R.C., M.K., R.J., V. Pauly, P.-A.J., and G.K. analyzed data; and R.C., M.K., C.A.D., and G.K. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This open access article is distributed under Creative Commons Attribution License 4.0 (CC BY).

[1]R.C. and M.K. contributed equally to this work.

[2]To whom correspondence may be addressed. Email: cdinare333@aol.com or gilles.kaplanski@ap-hm.fr.

This article contains supporting information online at https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2009017117/-/DCSupplemental.

Downloaded by guest on August 1, 2020

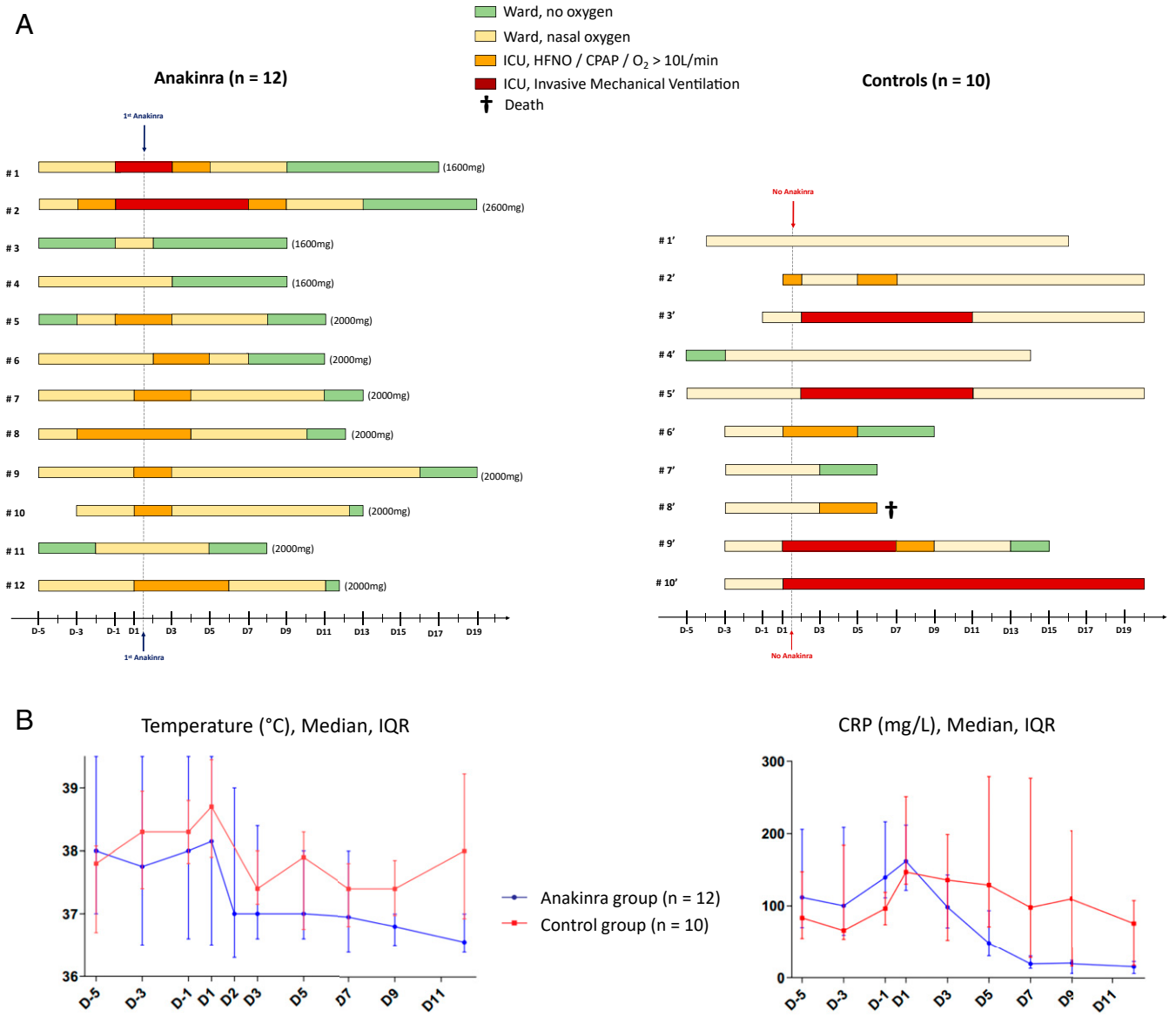


Fig. 1. (*A*) Daily disposition of the 12 patients treated with anakinra and the 10 control patients treated with standard of care only; the total dose of anakinra for each patient is indicated in parentheses. (*B*) Body temperatures (degrees Celsius), and CRP (milligrams per liter) evolution over time, in patients who received anakinra or in controls. IQR, interquartile range.

follow-up was recorded after 20 d. Dataset S1 details statistical analyses of the data and comparison with other studies using anakinra.

Twelve patients received anakinra, and 10 were in the control group. The groups were comparable in terms of age, gender, comorbidities, and the severity of the disease, as judged by the NEWS score at day 1. Seventy-two percent of patients in both groups were febrile, with systemic inflammation as judged by elevated CRP and ferritin concentrations (Dataset S1). Initial lung CT scans showed moderate to severe pneumonia (grade 3). Among the 10 patients from the control group, 4 required IMV, 2 required high-flow nasal oxygen (HFNO) in the ICU, and 4 patients in the wards required nasal oxygen flow of >10 L/min. One patient died, one patient was still intubated after day 20, and the 4 others left the ICU, with a mean of 9.5 d. Among the 12 patients who received anakinra, 2 required IMV, 6 required HFNO or continuous positive airway pressure (CPAP) in the ICU, and 4 required nasal oxygen flow of >10 L/min in the wards. All of the patients treated with anakinra survived and were discharged from the ICU, with a mean of 5 d (Fig. 1*A*).

Clinical improvement consisting of the NEWS score at day 5 ($P < 0.01$; Dataset S1) and the number of days with oxygen flow less than 3 L/min at day 20 ($P < 0.05$) was observed in the patients who received anakinra. Although the numbers of days without IMV was higher in the anakinra group, the difference did not reach statistical significance ($P < 0.06$). The response to anakinra was rapid, with reduction of fever within 48 h ($P < 0.05$; Fig. 1*B*), whereas fever persisted in some control patients despite allowance of paracetamol. There was rapid reduction of CRP in the anakinra group; the log-linear mixed model yielded a significant interaction between day and group ($P < 0.001$), showing that evolution of CRP was different between the two groups.

To compare groups at baseline and at particular end points, we used Fisher's exact test for qualitative variables and the nonparametric Mann–Whitney test for quantitative variables (two-sided, alpha error = 0.05). Qualitative variables are expressed using percentages, and quantitative variables are expressed using

Downloaded by guest on August 1, 2020

median and interquartile range. To analyze the evolution of CRP and temperature at different end points (days 1, 3, 5, 7, and 9), we performed two univariate mixed model (with log-linear distribution), with random intercept and group and interaction between groups and day as fixed effects.

Discussion

The clinical course of severe COVID-19 patients is the rapid deterioration of respiratory function associated with rising markers of systemic inflammation (CRP and ferritin). As we report here, clinical and biomarker rescue took place within 24 h to 48 h of the first dose of anakinra. Anakinra is a highly effective receptor antagonist because its affinity for IL-1R1 is greater than that for IL-1 itself (5). IL-1Ra prevents the inflammation driven by either IL-1α and IL-1β, and is approved to treat rheumatoid arthritis for subcutaneous (s.c.) administration of 100 mg daily, but is widely used off-label (11). Anakinra is also used i.v. to treat MAS, associated with a severe cytokine storm (12).

Stages 2b and 3 COVID-19 are characterized by high circulating levels of inflammatory cytokines, notably IL-6 (3). Although the anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, tocilizumab, has been used to treat COVID-19 patients (13, 14), any and all therapies that reduce the activities of either IL-1β or IL-1α consistently reduce circulating levels of IL-6 (5, 11). Because of the rapidity of action and the short half-life, we treated our patients with i.v. anakinra at 300 $mg{\cdot}d^{-1}$, a dose threefold higher than the approved s.c. dose of 100 mg, but five times lower than doses used to treat MAS (9, 12). Importantly, anakinra was started early in acute respiratory failure in order to arrest deterioration and reduce the need for IMV. With a total dose under 2,000 mg, anakinra resulted in a rapid fall in fever and CRP, reduced oxygen requirements, and led to fewer days in the ICU without IMV, compared to the control group. A study in 30 Italian COVID-19 patients reports efficacy and decreased deaths with anakinra in more severely affected patients, but required higher doses ($10\ mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}d^{-1}$) for a longer period of time (15). In the present study, a lower dose of $4\ mg{\cdot}kg^{-1}$ was administered for only 5 d, followed by a rapid tapering. Early use of anakinra may be an important clinical decision when respiratory conditions begin to deteriorate in the context of increasing systemic inflammation.

This report has limitations, such as the low number of patients and being a retrospective study. A prospective randomized, placebo-controlled study of anakinra in COVID-19 is planned by the French authorities (NCT04366232).

Data Deposition. All study data are included in the article and Dataset S1.

1. Z. Wu, J. M. McGoogan, Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72 314 cases. *JAMA* **323**, 1239–1242 (2020).
2. H. K. Siddiqi, M. R. Mehra, COVID-19 Illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. *J. Heart Lung Transplant.* **39**, 405–407 (2020).
3. G. Chen *et al*., Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J. Clin. Invest.* **130**, 2620–2629 (2020).
4. C.-S. Shi, N. R. Nabar, N.-N. Huang, J. H. Kehrl, SARS-Coronavirus Open Reading Frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. *Cell Death Discov.* **5**, 101 (2019).
5. G. Cavalli, C. A. Dinarello, Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases. *Front. Pharmacol.* **9**, 1157–1174 (2018).
6. G. Kaplanski, Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol. Rev.* **281**, 138–153 (2018).
7. J. Slaats, J. Ten Oever, F. L. van de Veerdonk, M. G. Netea, IL-1β/IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct inflammatory programs in infections. *PLoS Pathog.* **12**, e1005973 (2016).
8. A. A. Grom, A. Horne, F. De Benedetti, Macrophage activation syndrome in the era of biologic therapy. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 259–268 (2016).
9. B. Shakoory *et al*., Interleukin-1 receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of macrophage activation syndrome: Reanalysis of a prior Phase III Trial. *Crit. Care Med.* **44**, 275–281 (2016).
10. K. Li *et al*., The clinical and chest CT features associated with severe and critical COVID-19 pneumonia. *Invest. Radiol.* **55**, 327–331 (2020).
11. C. A. Dinarello, The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **15**, 612–632 (2019).
12. L. Adam Monteagudo, A. Boothby, E. Gertner *et al*., Continuous intravenous anakinra infusion to calm the cytokine storm in macrophage activation syndrome. *ACR Open Rheumatol.* **2**, 276–282 (2020).
13. P. Luo *et al*., Tocilizumab treatment in COVID-19: A single center experience. *J. Med. Virol.* **92**, 814–818 (2020).
14. M. Roumier, R. Paule, M. Groh, A. Vallee, F. Ackermann, Interleukin-6 blockade for severe COVID-19. medRxiv:2020.04.20.20061861 (22 April 2020).
15. G. Cavalli *et al*., Interleukin 1 blockade with high-dose anakinra in patients with COVID-19, acute respiratory distress syndrome, and hyperinflammation: A retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol.* **2**, e325–e331 (2020).

Downloaded by guest on August 1, 2020

4.3.3 Eléments de discussion

Ce travail présente deux limites évidentes : il s'agit d'un travail rétrospectif, sur une petite série de patients. Une autre étude rétrospective publiée au même moment (et donc sans co-prescription de Dexaméthasone) a montré également un effet protecteur de l'Anakinra dans les formes sévères de COVID-19.[408] Nous n'avons en aucun cas voulu croire que notre travail avait valeur de « preuve » de l'efficacité de l'Anakinra, mais simplement qu'il pouvait servir de justification à déployer des essais prospectifs randomisés.

Un essai prospectif randomisé en double aveugle a été réalisé et publié dans Nature Medicine en 2021, il a montré un effet bénéfique de l'Anakinra chez les patients qui avaient des taux de suPAR (Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor) > 6 ng/mL.[409] Une méta-analyse à laquelle nous avons participé a été publiée peu de temps après, retrouvant un bénéfice pour réduire la mortalité chez les patients les plus inflammatoires (CRP > 100 mg/L).[410] Ce travail est présenté en Annexe 10. De plus, il a été confirmé que le traitement était sûr, avec peu de complications infectieuses. Cependant, une autre méta-analyse récente ne retrouve pas d'effet sur la mortalité toutes causes confondues à J28.[411]

Nous pensons que ce traitement est particulièrement intéressant lorsqu'il est utilisé précocement, chez des patients sélectionnés (par exemple sur le taux de suPAR, ou de manière plus pragmatique sur la protéine C-réactive). En effet, en cas d'orage inflammatoire « avancé » avec des signes d'activation de la voie IL-18/IFNγ, l'Anakinra peut ne plus suffire. Une autre catégorie de molécule peut alors trouver sa place : les Jak inhibiteurs. En effet, l'IL-1β active la voie IL-6, et l'IL-18 active la voie de l'IFNγ. Or, ces deux cytokines se fixent sur des récepteurs Jak STAT qu'il est possible d'inhiber pharmacologiquement, par exemple avec le Ruxolitinib, un JAK1/2 inhibiteur. Un essai prospectif a d'ailleurs montré un effet protecteur du baricitinib[412] (associé au remdesivir). D'autres molécules anti-inflammatoires ont également été testées et largement utilisées pour le COVID-19, notamment la corticothérapie systémique, sous la forme de Dexaméthasone, qui a montré un bénéfice sur la mortalité chez les patients sévères (essai RECOVERY).[413] Le tocilizumab (anti-IL-6R) est également l'une des molécules qui a été bien étudiée, et qui a montré dans diverses études un bénéfice notamment chez les patients hypoxémiques avec une CRP > 75 mg/L.[414] Néanmoins, de nombreuses études avec critères d'inclusions et *outcomes* différents ont donné des résultats variables, rendant l'interprétation difficile.[415]

Au total, les traitements anti-inflammatoires participent largement au traitement des formes sévères de COVID-19. Nous pensons que l'Anakinra a sa place dans l'arsenal des drogues disponibles, notamment lorsqu'il est utilisé précocement. De plus, la courte demi-vie de ce médicament permet de suspendre son effet rapidement, en cas par exemple de complication infectieuse bactérienne avérée. L'Anakinra a eu l'autorisation de l'agence européenne du médicament en 2021 pour traiter les formes modérées à sévères de COVID-19. L'utilisation de ces traitements confirme ce qu'avait identifié l'illustre Sir William Osler en 1904 : « *Except on few occasions, the patient appears to die from the body's response to infection rather than from it* ».

4.4 Article original (Microorganisms, 2022)

4.4.1 Introduction

Les éosinophiles sont bien connus des internistes et hématologues, qui reçoivent régulièrement des patients pour éosinophilie (c'est-à-dire augmentation du taux d'éosinophiles à plus de 0.5 G/L). La norme inférieure des éosinophiles circulant est classiquement fixée autour de 0.05 G/L, mais des éosinophiles bas ne sont – en pratique clinique habituelle – pas une inquiétude pour le clinicien. Cette éosinopénie est d'ailleurs attendue lors d'un traitement par corticoïdes, ou lors de l'utilisation d'anti-IL-5.

Il est vite apparu que les patients hospitalisés pour COVID-19 étaient fréquemment éosinopéniques, et il nous a semblé que les patients avec éosinopénie (notamment ceux chez qui les éosinophiles étaient indosables) évoluaient plus souvent défavorablement. Deux questions se sont alors posées : 1) peut-on utiliser cette éosinopénie comme un biomarqueur pronostic, qui permettrait d'identifier en amont les patients les plus à risque de s'aggraver ? et 2) quel est le mécanisme de cette éosinopénie ?

Pour répondre à ces deux questions, nous avons analysé rétrospectivement les dossiers de 551 patients hospitalisés pour COVID-19 entre Mars et Juin 2020 dans 3 hôpitaux à Marseille (en excluant les patients sous cortisone). Notons à nouveau que les patients n'étaient pas traités par Dexaméthasone. Le critère de jugement principal était composite (oxygénorequérance > 6L/min et/ou admission en soins intensifs et/ou décès). Les résultats principaux de notre étude sont les suivants :

1. L'éosinopénie sévère (c'est-à-dire 0G/L) est fréquente chez les patients hospitalisés (51%) et est associée à un critère de jugement composite défavorable en analyse multivariée (OR = 2.58; IC95 [1.77–3.75] ; $p < 0.0001$).
2. Le sous-groupe de patients qui associent éosinopénie sévère + lymphopénie (<1 G/L) est celui ayant le plus mauvais pronostic
3. En réanimation, l'éosinopénie sévère est retrouvée chez des patients atteints de SDRA non liés au SARS-CoV-2, mais moins fréquemment (45% vs 70%)
4. L'éosinopénie sévère est associée à des taux augmentés de CRP, ferritine, IP-10 et suPAR (mais pas au taux de cortisol endogène). Les analyses autopsiques de 37 poumons de patients décédés n'ont pas mis en évidence d'éosinophiles. Nous supposons ainsi que l'éosinopénie est davantage une conséquence d'un profil cytokinique qu'une séquestration cellulaire sur le site de l'inflammation.

Notre étude a confirmé les études chinoises initiales,[416,417] décrivant que l'éosinopénie sévère (d'autant plus si elle est associée à une lymphopénie) pouvait constituer un biomarqueur pronostic accessible chez les patients hospitalisés pour COVID-19. Ces résultats doivent cependant être interprétés avec prudence, car d'inévitables biais de sélection en limite l'applicabilité.

4.4.2 L’article original

microorganisms

MDPI

Article

Eosinopenia as Predictor of Poor Outcome in Hospitalized COVID-19 Adult Patients from Waves 1 and 2 of 2020 Pandemic

Raphael Cauchois [1,*], Lea Pietri [2], Jean-Baptiste Dalmas [1], Marie Koubi [1], Thibaut Capron [3], Nadim Cassir [4], Nicola Potere [5], Ildo Polidoro [6], Rodolphe Jean [1], Pierre-André Jarrot [1], Baptiste Andre [7], Veronique Veit [7], Julien Carvelli [8], Vanessa Pauly [9], Pascal Chanez [3], Laurent Papazian [10] and Gilles Kaplanski [1]

1 Hôpital de la Conception, Internal Medicine and Clinical Immunology Department, APHM, INSERM, INRAE, C2VN, Aix Marseille Université, 13005 Marseille, France
2 Hôpital de la Conception, Endocrinology Department, APHM, Aix Marseille Université, 13005 Marseille, France
3 Hôpital Nord, Clinique des Bronches, Allergies et Sommeil Department, APHM, Aix Marseille Université, 13005 Marseille, France
4 IHU-Méditerranée Infection Department, IRD, AP-HM, MEPHI, Aix Marseille Université, 13005 Marseille, France
5 Department of Innovative Technologies in Medicine and Dentistry, "G. d'Annunzio" University, 66100 Chieti, Italy
6 Unit of Forensic Medicine, Local Health Authority of Pescara, 65100 Pescara, Italy
7 Hôpital de la Timone, Internal Medicine Department, APHM, Aix Marseille Université, 13005 Marseille, France
8 Hôpital de la Timone, Réanimation des Urgences Department, APHM, Aix Marseille Université, 13005 Marseille, France
9 CEReSS-Health Service Research and Quality of Life Center, Department of Medical Information, Hôpital de la Conception, APHM, 13005 Marseille, France
10 Hôpital Nord, Réanimation des Détresses Respiratoires et Infections Sévères Department, APHM, Aix Marseille Université, 13005 Marseille, France
* Correspondence: raphael.cauchois@ap-hm.fr; Tel.: +33-491381367

Abstract: During SARS-CoV-2 infection, eosinopenia may reflect a hyperactive immune response. In this study of hospitalized COVID-19 patients, we aimed to better understand the prognostic value of severe eosinopenia (absolute eosinophil count = 0 G/L) and decipher its underlying mechanisms. We retrospectively analyzed the records of COVID-19 patients hospitalized from March to June 2020 in three university hospitals in Marseille, France. We assessed the association between severe eosinopenia and a composite poor outcome in these patients, including the need for oxygen supplementation at >6 L/min, ICU admission, and in-hospital death. Among the 551 COVID-19 patients included in this study, severe eosinopenia was found in 228 (51%) of them on admission to hospital and was associated with a composite poor outcome using multivariate analysis (OR = 2.58; CI95 [1.77–3.75]; $p < 0.0001$). We found a significant association between the presence of severe eosinopenia on admission and the elevation in C-reactive protein, ferritin, IP-10, and suPAR. The histological findings in a series of 37 autopsies from patients who died from severe COVID-19 and presented with severe eosinopenia showed no pulmonary eosinophil trapping. Severe eosinopenia can be a reliable biomarker associated with a composite poor outcome in hospitalized COVID-19 adult patients. It may reflect the magnitude of immune hyperactivation during severe-to-critical COVID-19.

Keywords: eosinopenia; COVID-19; prognosis; biomarker

check for updates

Citation: Cauchois, R.; Pietri, L.; Dalmas, J.-B.; Koubi, M.; Capron, T.; Cassir, N.; Potere, N.; Polidoro, I.; Jean, R.; Jarrot, P.-A.; et al. Eosinopenia as Predictor of Poor Outcome in Hospitalized COVID-19 Adult Patients from Waves 1 and 2 of 2020 Pandemic. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2423. https://doi.org/10.3390/microorganisms10122423

Academic Editor: Antonella d'Arminio Monforte

Received: 14 October 2022
Accepted: 5 December 2022
Published: 7 December 2022

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

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The outbreak of the coronavirus disease 19 (COVID-19) caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is still spreading throughout the world and represents a major public health problem.

The first reports of this pandemic from Wuhan, China, revealed that up to 20% of hospitalized patients with COVID-19 developed bilateral interstitial pneumonia with hypoxemia (severe COVID-19), and nearly 5% progressed to acute respiratory distress syndrome (ARDS) requiring intensive care unit (ICU) admission and invasive mechanical ventilation (IMV) (critical COVID-19), potentially leading to multi-organ failure and death [1,2]. It was then shown that the progression to severe/critical COVID-19 was not primarily due to the direct damage induced by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) itself but rather to an exaggerated systemic innate immune response to the virus. This aberrant immune response, comparable to other hyperinflammatory syndromes such as hemophagocytic lymphohistiocytosis and sepsis, is characterized by strikingly elevated levels of inflammatory cytokines (e.g., interleukin[IL]-1, IL-6) and C-reactive protein (CRP) [3]. The elevation of D-dimer and ferritin levels as well as moderate leukocytosis and lymphocytopenia are also frequent in severe/critical COVID-19 patients [2,4]. Eosinophils, whose absolute peripheral count is normally below 0.04 G/L, are usually normal or elevated in inflammatory lung diseases such as infections, asthma, or systemic vasculitis [5]; eosinopenia is much rarer, except in patients receiving specific treatments such as steroids, interferon alpha (IFNa), or anti-IL-5 therapies [5]. Whereas previous studies have suggested that eosinopenia may be present in patients with COVID-19, its clinical relevance and underlying mechanisms remain uncertain [6–9].

In this study, we explore the association between severe eosinopenia and a composite poor outcome, including the need for oxygen supplementation at >6 L/min, ICU admission, and in-hospital death, in a large cohort of COVID-19 patients hospitalized during the first and second COVID-19 waves in France. In addition, we investigate the potential mechanisms driving eosinopenia in COVID-19.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Outcomes

We retrospectively analyzed the records of COVID-19 patients hospitalized from March to June 2020 in three Marseille University hospitals, France. We included, in the study, all patients hospitalized for more than two days, excluding those who had received systemic glucocorticoid therapy in the last three months. In this cohort of patients, the standard of care did not include at the time the glucocorticoid therapy for severe COVID-19 patients as later recommended by the RECOVERY study [10]. Our study was approved by the institutional review board of the Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (RGPD2020-47). COVID-19 diagnosis was based on the presence of functional respiratory symptoms, typical radiological findings on lung computed tomography (CT) scans, and positive RT-PCR tests for SARS-CoV-2 using nasopharyngeal swabs. Clinical data (including demographic data, comorbidities, symptoms, CT scans, and clinical outcomes) were extracted from electronic medical records. Laboratory assessments upon admission consisted of complete blood count, T-cell subset phenotyping, inflammatory biomarkers (C-reactive protein [CRP], ferritin), and troponin, liver, and kidney tests. Circulating cortisol (electrochemiluminescence), interferon gamma-induced protein 10 (IP-10, also known as C-X-C motif chemokine ligand 10 [CXCL10], Luminex, Austin, TX, USA), IL-6 (Luminex, Austin, TX, USA), and soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR, Virogates, Denmark) concentrations were prospectively measured in COVID-19 patients. Histopathological analyses were performed on lung specimens from 37 patients with fatal COVID-19 and severe eosinopenia from the "Hôpital Nord", Marseille, France, and the "Santo Spirito" Hospital, Pescara, Italy.

To investigate whether severe eosinopenia correlated with COVID-19 severity and prognosis, patients were divided into two groups according to their eosinophil levels on admission: patients with an absolute eosinophil count of 0 G/L were classified as "severe eosinopenia" group, and those with an eosinophil count greater than 0 G/L as "no severe eosinopenia" group. Furthermore, patients with severe eosinopenia were further stratified according to their lymphocyte levels (absolute lymphocyte count below or above 1 G/L), which have been previously shown to correlate with a COVID-19 worse outcome [11],

corresponding to the groups "severe eosinopenia plus lymphocytopenia" and "severe eosinopenia without lymphocytopenia". The groups are represented in the flow chart below (Figure 1). The occurrence of a composite poor outcome, including the need for oxygen therapy higher than 6 L/min, ICU admission, or in-hospital death, was assessed for all patients.

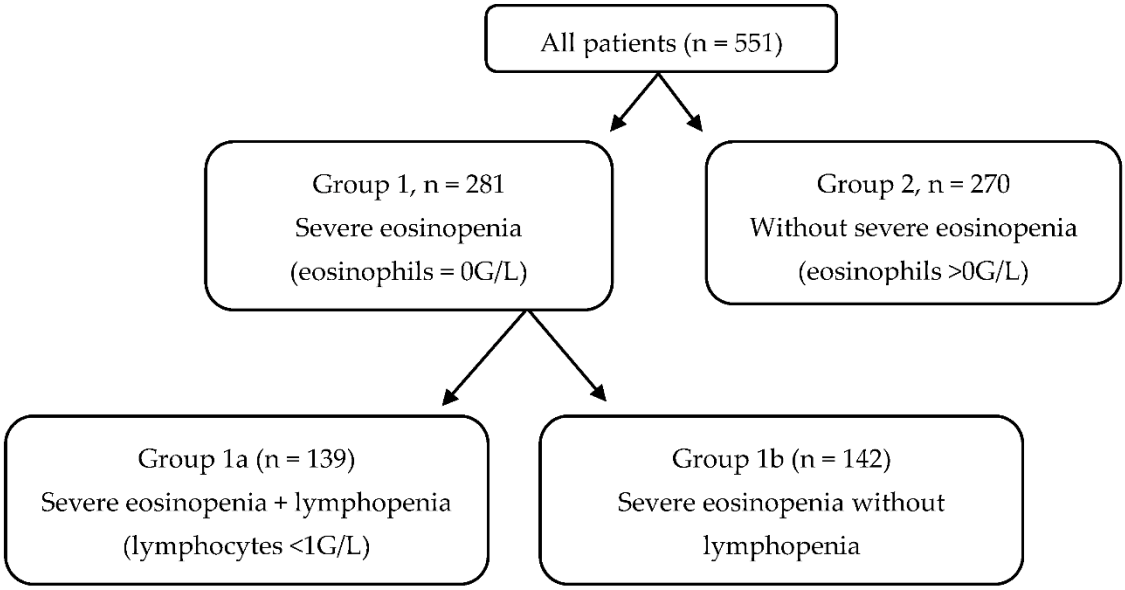


Figure 1. Flow Chart of the study cohort.

In addition, we compared the frequency of severe eosinopenia in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) to that of non-COVID-19 patients with ARDS from a historical cohort from the "Hôpital Nord", Marseille, France.

2.2. Statistical Analysis

Continuous variables with a normal distribution were described using the mean ± standard deviation (SD), and categorical variables were described using frequency with percentage. Univariate analyses were performed using chi^2 or Fisher's exact test for qualitative variables and t-test for quantitative variables. Multivariate logistic regression analysis was performed for "composite poor outcome" as the dependent variable. We firstly performed univariate logistic regression analyses, and we introduced into the multivariate model variables with a p-value < 0.20 in univariate analyses (after removing intermediary outcomes and collinear ones). We then applied a backward elimination so as to conserve variables whose adjusted p-value was less than 0.05. Age, sex, body mass index (BMI), hypertension, and diabetes were forced into the multivariate analysis.

Due to the high amount of missing data for BMI (168 patients did not have a reported BMI), and to check the robustness of the model with respect to the criterion "severe eosinopenia" in the multivariate analysis, a multiple imputation of the missing data for the BMI variable was performed. The variables used for multiple imputation of missing data were ferritin and presence of high blood pressure. We performed 20 samples with imputed data from which we performed the logistic regressions. The goodness-of-fit of the model was assessed using the Hosmer and Lemeshow test. First, we performed the multivariate analysis without BMI. Then, we performed multivariate analysis with multiple imputation of missing data for the BMI variable. Statistics were performed using SAS® software. Comparisons of mean cortisol and IP-10 levels were performed using unpaired non-parametric t-test. Statistics were performed using the SAS® software, and the statistical significance yielded at alpha = 0.05.

3. Results

A total of 551 COVID-19 patients were included in this study. On hospital admission, 73.50% (n = 405) of patients had eosinopenia (absolute eosinophil count <0.04 G/L), of whom 51% (n = 281) had undetectable eosinophils (severe eosinopenia). The main clinical, laboratory, and radiological characteristics of patients with severe eosinopenia are shown in Table 1 and compared to those of patients without severe eosinopenia.

Table 1. Baseline characteristics and biological features of hospitalized COVID-19 patients with and without severe eosinopenia.

	Severe Eosinopenia (Group 1)	**Without Severe Eosinopenia (Group 2)**	***p***
	(n = 281)	(n = 270)	
Demographics: mean (standard deviation) or absolute number (percentage)			
Age, years	65.13 (15.02)	64.33 (16.32)	0.552
Male/female	131 (46.6%)/150 (53.4%)	139 (51.5%)/131 (48.5%)	0.253
Comorbidities: Absolute number (%)			
Diabetes	80 (28.47%)	78 (28.89%)	0.913
High blood pressure	121 (43.06%)	140 (51.85%)	0.042
Body mass index > 30 kg/m^2	72 (25.62%)	53 (19.63%)	0.064
Cardiovascular disease *	37 (13.17%)	38 (14.07%)	0.756
Immunosuppression **	31 (11.03%)	39 (14.44%)	0.229
Chronic respiratory disease ***	43 (15.30%)	52 (19.26%)	0.219
Tobacco smoking	49 (17.44%)	71 (26.30%)	0.011
Initial laboratory results: mean (SD)			
Leucocytes, G/L	7.66 (5.83)	7.71 (4.65)	0.908
Neutrophils, G/L	6.05 (4.44)	5.38 (3.70)	0.05
Lymphocytes, G/L	1.02 (0.81)	1.53 (1.55)	<0.001
CD3 + (/mm3)	811 (522)	1075 (620)	0.021
CD3 + CD4 + (mm3)	485.8 (291.8)	682.2 (419.5)	0.001
CD3 + CD8 + (/mm3)	286.6 (237.6)	364.8 (256.5)	0.054
CD19 + (/mm3)	182.2 (193)	181.8 (159)	0.981
CD16 + CD56 + CD3- (/mm3)	196.1 (143.2)	211.9 (183.1)	0.543
Neutrophil to lymphocyte ratio	7.66 (13.95)	6.07 (6.38)	<0.001
Monocytes, G/L	0.51 (0.64)	0.96 (5.37)	0.169
Hemoglobin, g/dL	13.23 (1.94)	14.14 (10.95)	0.179
Platelets, G/L	198 (82)	240 (100)	<0.001
C-reactive protein, mg/L	112.3 (86.2)	82.9 (82.2)	<0.001
Ferritin, µg/L	1367 (1146)	890 (917)	<0.001
Fibrinogen, g/L	6.29 (1.57)	5.89 (1.70)	0.018
Albumin, g/L	36.74 (4.87)	36.70 (6.10)	0.945
Creatinin, µmol/L	92.86 (54.05)	94.17 (63.19)	0.794
ASAT, IU/L	61.51 (46.77)	45.21 (28.75)	0.003
LDH, IU/L	373.2 (129.5)	322.4 (130.4)	<0.001
Troponin, ng/L	42.34 (146.80)	30.69 (39.43)	0.4
CT scan: Absolute number (%)			
Severe or critical CT scan	170 (60.5%)	137 (50.7%)	0.033

* Coronary or peripheral vascular disease. ** Pre-existing cancer, immunosuppressant, HIV. *** Asthma or chronic obstructive pulmonary disease.

Severe eosinopenia at admission was associated with a higher neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) (7.66 vs. 6.07; $p < 0.001$), a lower lymphocyte count ($p < 0.001$) with a CD4+ lymphopenia (486/mm3 vs. 682/mm3; $p = 0.001$), and a higher platelet count ($p < 0.001$). Severe eosinopenia was also significantly associated with the elevation of inflammatory markers including CRP ($p < 0.001$), fibrinogen ($p < 0.05$), ferritin ($p < 0.001$), IP-10 ($p < 0.05$), and suPAR levels ($p < 0.05$). More precisely, the eosinophil count was negatively correlated with the suPAR level (r = 0.39, $p < 0.01$). Conversely, we found no difference in blood cortisol and IL-6 levels when comparing patients with and without severe eosinopenia (Table 2).

Table 2. suPAR, IP-10, IL-6, and cortisol levels in hospitalized COVID-19 patients with and without severe eosinopenia.

	Severe Eosinopenia (Group 1)	**Without Severe Eosinopenia (Group 2)**	***p***
	Mean (SD)		
suPAR	10.210 (5.4)	6.643 (6.6)	0.0334
IP-10	142.8 (122.9)	84.04 (70.2)	0.0301
Interleukin-6 (pg/mL)	47.37 (53.7)	51.35 (55.4)	0.7935
Blood cortisol (nmol/L)	458 (318)	483 (174)	0.7345

Severe eosinopenia on admission was associated with a composite poor outcome, (34.87% vs. 21.11%; $p < 0.001$, Table 3) and with death (15.30% vs. 7.03%, $p < 0.001$).

Table 3. Mortality and composite poor outcome including ICU admission and/or oxygen at >6 L/min and/or death in hospitalized COVID-19 patients with and without severe eosinopenia.

	Severe Eosinopenia (Group 1)	**Without Severe Eosinopenia (Group 2)**	***p***
	(*n* = 281)	(*n* = 270)	
	Absolute number (%)		
Composite poor outcome	98 (34.87%)	57 (21.11%)	<0.001
Death	43 (15.30%)	19 (7.03%)	<0.001

Specifically, severe eosinopenia was associated with a higher rate of in-hospital mortality (15.30% vs. 7.03%; $p < 0.001$), a longer requirement for oxygen therapy (12.26 days vs. 7.71 days; $p < 0.001$), and a higher length of hospital stay (mean 13.72 days vs. 11.81 days; $p < 0.05$). In addition, patients with severe eosinopenia showed more frequently severe or critical lung damage on their CT scans (60.5% vs. 50.7%, $p < 0.05$).

The concomitant presence of both severe eosinopenia and lymphocytopenia on admission was associated with even worse outcomes: patients with severe eosinopenia plus lymphopenia (*n* = 139) more frequently showed a composite poorer outcome (53.95% vs. 19.66%; $p < 0.001$), including a higher mortality rate (17.26% vs. 9.15%; $p < 0.001$) than other patients (Table 4).

Table 4. Mortality and composite poor outcome including ICU admission and/or oxygen at >6 L/min and/or death in hospitalized COVID-19 patients with and without severe eosinopenia + lymphopenia.

	Severe Eosinopenia and Lymphopenia (Group 1a)	**Other Patients**	***p***
	(*n* = 139)	(*n* = 412)	
	Absolute number (%)		
Composite poor outcome	75 (53.95%)	81 (19.66%)	<0.001
Death	24 (17.26%)	38 (9.22%)	<0.001

Using multivariate analysis, severe eosinopenia, in general, was independently associated with a composite poor outcome (OR = 2.58 CI [1.77–3.75]; $p < 0.0001$), as were obesity (OR = 2.34 CI [1.5–3.66]; $p < 0.001$) and male gender (OR = 1.48 CI [1.02–2.15]; $p < 0.05$) (Table 5).

Table 5. Multivariate analysis of factors associated with a composite poor outcome.

	OR (IC 95%)	***p***
Eosinophils = 0 G/L	2.58 (1.77–3.75)	<0.0001
Male gender	1.48 (1.02–2.15)	0.0371
BMI $\geq$ 30 kg/m^2	2.34 (1.50–3.66)	0.0002
Age $\geq$ 65	1.35 (0.90–2.02)	0.1447
High blood pressure	1.36 (0.90–2.05)	0.1492
Type 2 diabetes	0.99 (0.64–1.51)	0.9465

Severe eosinopenia in patients with COVID19-related ARDS was more frequent than in patients with non-COVID-19 ARDS (70% vs. 45%; $p < 0.0001$). Etiologies of non-COVID-19 ARDS are detailed in Table 6.

Table 6. Etiology of ARDS not related to SARS-CoV2.

Etiology of ARDS Not Related to SARS-CoV2 (*n* = 118), Absolute Number (%)	
Bacterial pneumonia	67 (56.78%)
Ventilator-associated pneumonia	8 (6.78%)
Viral pneumonia	11 (9.32%)
Pulmonary embolism	3 (2.54%)
Pulmonary fibrosis	5 (4.24%)
Hemoptysis	4 (3.39%)
Atelectasis	6 (5.08%)
Drowning	1 (0.85%)
Traumatic	5 (4.24%)
Others	8 (6.78%)

A histological analysis, performed in a series of 37 autopsies of patients who had died from COVID-19-related ARDS, revealed the presence of vascular wall thickening (100%), perivascular lymphocytic infiltrate (40%), thrombi (60%), small- and medium-sized vasculitis (80%), lung fibrosis (60%), diffuse interstitial disease (60%), alveolar condensation (60%), cell necrosis (40%), and bronchial destruction (80%), but in none of the analyzed sections was eosinophil trapping observed (Figure 2).

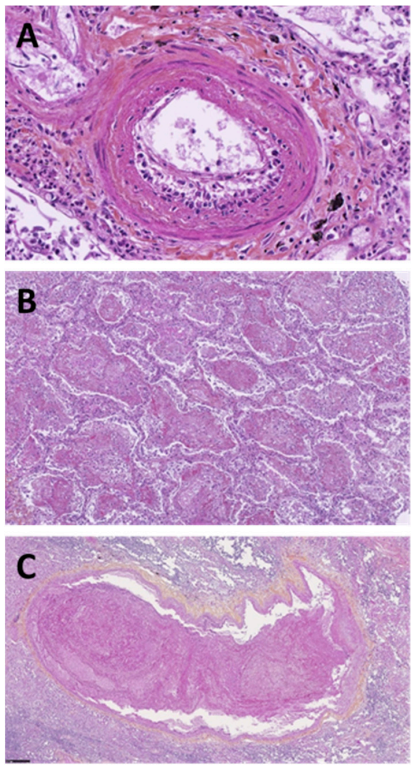


Figure 2. Lung histopathology in fatal COVID-19. (**A**) Hematein–eosin–saffron staining at magnification ×300; presence of endothelitis: thickening of the intima of a small-caliber arteriole with cell proliferation, intimal edema, and lymphocytic infiltrate. (**B**) Hematein–eosin–saffron staining at magnification ×70; filling of the alveoli with hyaline membranes and thick fibrin; presence of dystrophic pneumocytes desquamating in the lumens showing acute alveolar damage. (**C**) Hematein–eosin–saffron staining at magnification ×50; fibrin clot.

4. Discussion

In this multicentric cohort of 551 hospitalized COVID-19 patients, severe eosinopenia was significantly and independently associated with a composite poor outcome including the need for oxygen supplementation at >6 L/min, ICU admission, and in-hospital death. This confirms the previous findings. Indeed, in one of the first studies from Wuhan, China, reporting on the clinical characteristics of patients with COVID-19, eosinopenia was found in almost all patients who died (81.2%), whereas it was less frequent in patients who survived with non-severe and severe COVID-19 (60.7 and 47.6%, respectively) [12,13]. Similarly, in their study on the longitudinal hematologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China, Chen et al. found that most of the severe/critical and fatal patients demonstrated eosinopenia on admission. They also reported that eosinophils continually increased and reached significantly higher levels in survivors than in non-survivors [3]. More recently, in a smaller cohort of hospitalized COVID-19 patients, Tong et al. found that the death rate in a low eosinophils group was higher, and no patients died in the normal eosinophils group (16.7% vs. 0, $p < 0.001$) [14]. Altogether, we added evidence to the finding that the absolute eosinophil count may serve as a reliable prognostic biomarker for patients hospitalized with COVID-19.

In addition, eosinopenia has also been reported in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome (MERS-CoV) [15]. In patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease, lower eosinophil counts were associated with poorer clinical outcomes [16,17].

In this study, we found that the frequency of severe eosinopenia was significantly higher in patients with COVID-19-related ARDS than in those with COVID-19 unrelated ARDS. To avoid possible bias caused by the use of corticosteroids and its effect on eosinophils, we included only COVID-19 patients without recent or current exposure to the drug (and before the standard of care included glucocorticoids as recommended by the results of the RECOVERY study) [10]. Recently, Chen et al. found that higher eosinophil counts were related to lower 28-day mortality in a large cohort of ARDS patients (n = 2567) [18]. The authors showed that this relationship could be counteracted using corticosteroids.

However, the precise mechanisms underlying eosinopenia associated with COVID-19 remain unclear at this time. As eosinophils have anti-viral properties and the ability to migrate into tissues [5], the trapping of eosinophils into the injured lungs has been evoked to potentially account for the depletion of circulating eosinophils. In our analysis of lung histology from a series of 37 autopsies, we did not find evidence of eosinophilic pulmonary infiltrates in the lungs of patients with fatal COVID-19 and initial severe eosinopenia. This is consistent with previous histopathological studies [19].

In addition, severe eosinopenia may reflect the intense innate immune response associated with severe/critical COVID-19 and may thus represent an indicator of hyperinflammation/immune exhaustion. In this study, we observed that in COVID-19 patients, severe eosinopenia was associated with elevated circulating concentrations of IP-10, an inflammatory chemokine whose levels have been strongly associated with ARDS occurrence [20]. Furthermore, eosinopenia was associated with higher levels of suPAR, which derives from the cleavage of membrane-bound uPAR that occurs during intense immune activation [21]. Notably, suPAR has recently been demonstrated as an early inflammatory biomarker in patients with COVID-19 [22].

Stress-based cortisol responses which in other circumstances might lead to eosinopenia have been reported to be impaired in moderate-to-severe COVID-19 [23]. In this study, eosinopenia was not associated with higher plasma levels of cortisol, adding evidence to the fact that eosinopenia is not likely secondary to the cortisol inhibitory activity on eosinophil precursors in COVID-19 [24].

Despite the high number of patients included and the large data analyzed, our study has some limitations. First, its retrospective design is vulnerable to biases. Second, we analyzed the biological markers only at the time of hospital admission and not longitudi-

nally. Third, we included patients hospitalized during the first and second waves in France, and as such our results cannot be extrapolated to other spatiotemporal populations. In particular, the strains circulating during these waves corresponded to clades 20A, 20B, 20C (first phase, February–May 2020), the Pangolin lineage B.1.177, and B.1.160 variant (second phase, June–December 2020) [25]; these are mostly different from those circulating during later waves and associated with different clinical outcomes [26].

Further studies—including in vitro, in vivo, and larger clinical studies—exploring the specific effects of a wider range of inflammatory cytokines in COVID-19 patients are needed. A possible direct cytotoxic effect of SARS-CoV-2 on eosinophils would merit further investigation. In addition, the distinct effects of different anti-cytokine strategies (e.g., corticosteroids, IL-1/IL-6/JAK-STAT inhibition) on eosinophils in patients with COVID-19 should be further appraised.

5. Conclusions

Severe eosinopenia can be a reliable biomarker associated with a composite poor outcome in hospitalized COVID-19 adult patients. It may reflect the magnitude of immune hyperactivation during severe-to-critical COVID-19.

Author Contributions: R.C., L.P. (Lea Pietri), J.-B.D., M.K., R.J., P.-A.J. and G.K. had full access to all data in the study and take responsibility for the data and the accuracy of the data analysis; Study concept and design: R.C., L.P. (Lea Pietri), J.-B.D., M.K., P.-A.J. and G.K.; Acquisition, analysis, or interpretation of data: R.C., L.P. (Lea Pietri), J.-B.D., M.K., T.C., B.A., N.C., R.J., J.C., V.P., V.V., P.C., L.P. (Laurent Papazian) and G.K.; Autopsy: N.P. and I.P.; Drafting of the manuscript: R.C., N.C., J.-B.D. and G.K.; Study supervision: G.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of the Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (RGPD2020-47). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: For original data, please contact the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Siddiqi, H.K.; Mehra, M.R. COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. *J. Heart Lung Transpl.* **2020**, *39*, 405–407. [CrossRef] [PubMed]
2. Wang, D.; Hu, B.; Hu, C.; Zhu, F.; Liu, X.; Zhang, J.; Wang, B.; Xiang, H.; Cheng, Z.; Xiong, Y.; et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* **2020**. [CrossRef]
3. Chen, G.; Wu, D.; Guo, W.; Cao, Y.; Huang, D.; Wang, H.; Wang, T.; Zhang, X.; Chen, H.; Yu, H.; et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 2620–2629. [CrossRef] [PubMed]
4. Zhou, F.; Yu, T.; Du, R.; Fan, G.; Liu, Y.; Liu, Z.; Xiang, J.; Wang, Y.; Song, B.; Gu, X.; et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *Lancet* **2020**, *395*, 1054–1062. [CrossRef] [PubMed]
5. Lindsley, A.W.; Schwartz, J.T.; Rothenberg, M.E. Eosinophil responses during COVID-19 infections and coronavirus vaccination. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2020**, *146*, 1–7. [CrossRef] [PubMed]
6. Sun, Y.; Dong, Y.; Wang, L.; Xie, H.; Li, B.; Chang, C.; Wang, F.-S. Characteristics and prognostic factors of disease severity in patients with COVID-19: The Beijing experience. *J. Autoimmun.* **2020**, *112*, 102473. [CrossRef] [PubMed]
7. Cazzaniga, M.; Fumagalli, L.A.M.; D'angelo, L.; Cerino, M.; Bonfanti, G.; Fumagalli, R.M.; Schiavo, G.; Lorini, C.; Lainu, E.; Terragni, S.; et al. Eosinopenia is a reliable marker of severe disease and unfavourable outcome in patients with COVID-19 pneumonia. *Int. J. Clin. Pract.* **2021**, *75*, e14047. [CrossRef] [PubMed]
8. Soni, M. Original Article: Evaluation of eosinopenia as a diagnostic and prognostic indicator in COVID-19 infection. *Int. J. Lab. Hematol.* **2021**, *43*, e303. [CrossRef] [PubMed]
9. Yan, B.; Yang, J.; Xie, Y.; Tang, X. Relationship between blood eosinophil levels and COVID-19 mortality. *World Allergy Organ J.* **2021**, *14*, 100521. [CrossRef]

10. RECOVERY Collaborative Group; Horby, P.; Lim, W.S.; Emberson, J.R.; Mafham, M.; Bell, J.L.; Linsell, L.; Staplin, N.; Brightling, C.; Ustianowski, A.; et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 693–704. [CrossRef]
11. Lee, J.; Park, S.-S.; Kim, T.Y.; Lee, D.-G.; Kim, D.-W. Lymphopenia as a Biological Predictor of Outcomes in COVID-19 Patients: A Nationwide Cohort Study. *Cancers* **2021**, *13*, 471. [CrossRef] [PubMed]
12. Zhang, J.-J.; Dong, X.; Cao, Y.-Y.; Yuan, Y.-D.; Yang, Y.-B.; Yan, Y.-Q.; Akdis, C.A.; Gao, Y.-D. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy* **2020**, *75*, 1730–1741. [CrossRef] [PubMed]
13. Du, Y.; Tu, L.; Zhu, P.; Mu, M.; Wang, R.; Yang, P.; Wang, X.; Hu, C.; Ping, R.; Hu, P.; et al. Clinical Features of 85 Fatal Cases of COVID-19 from Wuhan. A Retrospective Observational Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, *201*, 1372–1379. [CrossRef] [PubMed]
14. Tong, X.; Cheng, A.; Yuan, X.; Zhong, X.; Wang, H.; Zhou, W.; Xu, X.; Li, Y. Characteristics of peripheral white blood cells in COVID-19 patients revealed by a retrospective cohort study. *BMC Infect. Dis.* **2021**, *21*, 1236. [CrossRef]
15. Lee, Y.-S.; Chen, C.-H.; Chao, A.; Chen, E.-S.; Wei, M.-L.; Chen, L.-K.; Yang, K.D.; Lin, M.-C.; Wang, Y.-H.; Liu, J.-W.; et al. Molecular signature of clinical severity in recovering patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). *BMC Genom.* **2005**, *6*, 132. [CrossRef]
16. Garnacho-Montero, J.; Huici-Moreno, M.J.; Gutiérrez-Pizarraya, A.; López, I.; Márquez-Vácaro, J.A.; Macher, H.; Guerrero, J.M.; Puppo-Moreno, A. Prognostic and diagnostic value of eosinopenia, C-reactive protein, procalcitonin, and circulating cell-free DNA in critically ill patients admitted with suspicion of sepsis. *Crit. Care* **2014**, *18*, R116. [CrossRef] [PubMed]
17. MacDonald, M.I.; Osadnik, C.R.; Bulfin, L.; Hamza, K.; Leong, P.; Wong, A.; King, P.T.; Bardin, P.G. Low and High Blood Eosinophil Counts as Biomarkers in Hospitalized Acute Exacerbations of COPD. *Chest* **2019**, *156*, 92–100. [CrossRef]
18. Chen, H.-T.; Xu, J.-F.; Huang, X.-X.; Zhou, N.-Y.; Wang, Y.-K.; Mao, Y. Blood eosinophils and mortality in patients with acute respiratory distress syndrome: A propensity score matching analysis. *World J. Emerg. Med.* **2021**, *12*, 131–136. [CrossRef]
19. Xu, Z.; Shi, L.; Wang, Y.; Zhang, J.; Huang, L.; Zhang, C.; Liu, S.; Zhao, P.; Liu, H.; Zhu, L.; et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* **2020**, *8*, 420–422. [CrossRef]
20. Yang, Y.; Shen, C.; Li, J.; Yuan, J.; Wei, J.; Huang, F.; Wang, F.; Li, G.; Li, Y.; Xing, L.; et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2020**, *146*, 119–127.e4. [CrossRef]
21. Backes, Y.; van der Sluijs, K.F.; Mackie, D.P.; Tacke, F.; Koch, A.; Tenhunen, J.J.; Schultz, M.J. Usefulness of suPAR as a biological marker in patients with systemic inflammation or infection: A systematic review. *Intensive Care Med.* **2012**, *38*, 1418–1428. [CrossRef] [PubMed]
22. Kyriazopoulou, E.; Poulakou, G.; Milionis, H.; Metallidis, S.; Adamis, G.; Tsiakos, K.; Fragkou, A.; Rapti, A.; Damoulari, C.; Fantoni, M.; et al. Early treatment of COVID-19 with anakinra guided by soluble urokinase plasminogen receptor plasma levels: A double-blind, randomized controlled phase 3 trial. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1752–1760. [CrossRef] [PubMed]
23. Alzahrani, A.S.; Mukhtar, N.; Aljomaiah, A.; Aljamei, H.; Bakhsh, A.; Alsudani, N.; Elsayed, T.; Alrashidi, N.; Fadel, R.; Alqahtani, E.; et al. The Impact of COVID-19 Viral Infection on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Endocr. Pract.* **2021**, *27*, 83–89. [CrossRef] [PubMed]
24. Bro-Rasmussen, F. Effect of cortisol on the eosinophils in the rat spleen. Autoradiographic studies. *Scand. J. Haematol.* **1973**, *11*, 59–70. [CrossRef]
25. Hoang, V.-T.; Colson, P.; Levasseur, A.; Delerce, J.; Lagier, J.-C.; Parola, P.; Million, M.; Fournier, P.-E.; Raoult, D.; Gautret, P. Clinical outcomes in patients infected with different SARS-CoV-2 variants at one hospital during three phases of the COVID-19 epidemic in Marseille, France. *Infect. Genet. Evol.* **2021**, *95*, 105092. [CrossRef]
26. Dao, T.L.; Hoang, V.T.; Nguyen, N.N.; Delerce, J.; Chaudet, H.; Levasseur, A.; Lagier, J.C.; Raoult, D.; Colson, P.; Gautret, P. Clinical outcomes in COVID-19 patients infected with different SARS-CoV-2 variants in Marseille, France. *Clin. Microbiol. Infect.* **2021**, *27*, 1516.e1–1516.e6. [CrossRef]

4.3.3 Eléments de discussion

Ce travail présente deux limites évidentes : il s'agit d'un travail rétrospectif, sur une petite série de patients. Une autre étude rétrospective publiée au même moment (et donc sans co-prescription de Dexaméthasone) a montré également un effet protecteur de l'Anakinra dans les formes sévères de COVID-19.[408] Nous n'avons en aucun cas voulu croire que notre travail avait valeur de « preuve » de l'efficacité de l'Anakinra, mais simplement qu'il pouvait servir de justification à déployer des essais prospectifs randomisés.

Un essai prospectif randomisé en double aveugle a été réalisé et publié dans Nature Medicine en 2021, il a montré un effet bénéfique de l'Anakinra chez les patients qui avaient des taux de suPAR (Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor) > 6 ng/mL.[409] Une méta-analyse à laquelle nous avons participé a été publiée peu de temps après, retrouvant un bénéfice pour réduire la mortalité chez les patients les plus inflammatoires (CRP > 100 mg/L).[410] Ce travail est présenté en Annexe 10. De plus, il a été confirmé que le traitement était sûr, avec peu de complications infectieuses. Cependant, une autre méta-analyse récente ne retrouve pas d'effet sur la mortalité toutes causes confondues à J28.[411]

Nous pensons que ce traitement est particulièrement intéressant lorsqu'il est utilisé précocement, chez des patients sélectionnés (par exemple sur le taux de suPAR, ou de manière plus pragmatique sur la protéine C-réactive). En effet, en cas d'orage inflammatoire « avancé » avec des signes d'activation de la voie IL-18/IFNγ, l'Anakinra peut ne plus suffire. Une autre catégorie de molécule peut alors trouver sa place : les Jak inhibiteurs. En effet, l'IL-1β active la voie IL-6, et l'IL-18 active la voie de l'IFNγ. Or, ces deux cytokines se fixent sur des récepteurs Jak STAT qu'il est possible d'inhiber pharmacologiquement, par exemple avec le Ruxolitinib, un JAK1/2 inhibiteur. Un essai prospectif a d'ailleurs montré un effet protecteur du baricitinib[412] (associé au remdesivir). D'autres molécules anti-inflammatoires ont également été testées et largement utilisées pour le COVID-19, notamment la corticothérapie systémique, sous la forme de Dexaméthasone, qui a montré un bénéfice sur la mortalité chez les patients sévères (essai RECOVERY).[413] Le tocilizumab (anti-IL-6R) est également l'une des molécules qui a été bien étudiée, et qui a montré dans diverses études un bénéfice notamment chez les patients hypoxémiques avec une CRP > 75 mg/L.[414] Néanmoins, de nombreuses études avec critères d'inclusions et *outcomes* différents ont donné des résultats variables, rendant l'interprétation difficile.[415]

Au total, les traitements anti-inflammatoires participent largement au traitement des formes sévères de COVID-19. Nous pensons que l'Anakinra a sa place dans l'arsenal des drogues disponibles, notamment lorsqu'il est utilisé précocement. De plus, la courte demi-vie de ce médicament permet de suspendre son effet rapidement, en cas par exemple de complication infectieuse bactérienne avérée. L'Anakinra a eu l'autorisation de l'agence européenne du médicament en 2021 pour traiter les formes modérées à sévères de COVID-19. L'utilisation de ces traitements confirme ce qu'avait identifié l'illustre Sir William Osler en 1904 : « *Except on few occasions, the patient appears to die from the body's response to infection rather than from it* ».

4.4 Article original (Microorganisms, 2022)

4.4.1 Introduction

Les éosinophiles sont bien connus des internistes et hématologues, qui reçoivent régulièrement des patients pour éosinophilie (c'est-à-dire augmentation du taux d'éosinophiles à plus de 0.5 G/L). La norme inférieure des éosinophiles circulant est classiquement fixée autour de 0.05 G/L, mais des éosinophiles bas ne sont – en pratique clinique habituelle – pas une inquiétude pour le clinicien. Cette éosinopénie est d'ailleurs attendue lors d'un traitement par corticoïdes, ou lors de l'utilisation d'anti-IL-5.

Il est vite apparu que les patients hospitalisés pour COVID-19 étaient fréquemment éosinopéniques, et il nous a semblé que les patients avec éosinopénie (notamment ceux chez qui les éosinophiles étaient indosables) évoluaient plus souvent défavorablement. Deux questions se sont alors posées : 1) peut-on utiliser cette éosinopénie comme un biomarqueur pronostic, qui permettrait d'identifier en amont les patients les plus à risque de s'aggraver ? et 2) quel est le mécanisme de cette éosinopénie ?

Pour répondre à ces deux questions, nous avons analysé rétrospectivement les dossiers de 551 patients hospitalisés pour COVID-19 entre Mars et Juin 2020 dans 3 hôpitaux à Marseille (en excluant les patients sous cortisone). Notons à nouveau que les patients n'étaient pas traités par Dexaméthasone. Le critère de jugement principal était composite (oxygénorequérance > 6L/min et/ou admission en soins intensifs et/ou décès). Les résultats principaux de notre étude sont les suivants :

1. L'éosinopénie sévère (c'est-à-dire 0G/L) est fréquente chez les patients hospitalisés (51%) et est associée à un critère de jugement composite défavorable en analyse multivariée (OR = 2.58; IC95 [1.77–3.75] ; $p < 0.0001$).
2. Le sous-groupe de patients qui associent éosinopénie sévère + lymphopénie (<1 G/L) est celui ayant le plus mauvais pronostic
3. En réanimation, l'éosinopénie sévère est retrouvée chez des patients atteints de SDRA non liés au SARS-CoV-2, mais moins fréquemment (45% vs 70%)
4. L'éosinopénie sévère est associée à des taux augmentés de CRP, ferritine, IP-10 et suPAR (mais pas au taux de cortisol endogène). Les analyses autopsiques de 37 poumons de patients décédés n'ont pas mis en évidence d'éosinophiles. Nous supposons ainsi que l'éosinopénie est davantage une conséquence d'un profil cytokinique qu'une séquestration cellulaire sur le site de l'inflammation.

Notre étude a confirmé les études chinoises initiales,[416,417] décrivant que l'éosinopénie sévère (d'autant plus si elle est associée à une lymphopénie) pouvait constituer un biomarqueur pronostic accessible chez les patients hospitalisés pour COVID-19. Ces résultats doivent cependant être interprétés avec prudence, car d'inévitables biais de sélection en limite l'applicabilité.

4.4.2 L’article original

Annexe 2 : Tellier *et al*, Haematologica 2022

Annexe 3 : El Sissy *et al*, Blood 2021

Check for updates

6. Rashidi A, Fisher SI. FISH-negative, cytogenetically cryptic acute promyelocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2015;5(6):e320.

7. Ninomiya M, Takahashi M, Nishizawa T, Shimosegawa T, Okamoto H. Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):507-514.

8. Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, et al. Species-specific TT viruses in humans and nonhuman primates and their phylogenetic relatedness. *Virology.* 2000;277(2):368-378.

9. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, et al; Study Alliance Leukemia. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013;369(2):111-121.

10. Strocchio L, Gurnari C, Santoro N, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for childhood acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2019;185(2):360-363.

11. Cheng Y, Zhang L, Wu J, Lu A, Wang B, Liu G. Long-term prognosis of childhood acute promyelocytic leukaemia with arsenic trioxide administration in induction and consolidation chemotherapy phases: a single-centre experience. *Eur J Haematol.* 2013;91(6):483-489.

12. Creutzig U, Dworzak MN, Bochennek K, et al. First experience of the AML-Berlin-Frankfurt-Münster group in pediatric patients with standard-risk acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide and all-trans retinoid acid. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(8):e26461.

13. Testi AM, Moleti ML, Canichella M, et al. Very late relapse in a patient with acute promyelocytic leukemia (APL) rescued with a chemotherapy-free protocol. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(4):999-1001.

14. Testi AM, Pession A, Diverio D, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia: results from the International Consortium for Childhood APL. *Blood.* 2018;132(4):405-412.

15. Reiter A, Saussele S, Grimwade D, et al. Genomic anatomy of the specific reciprocal translocation t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;36(2):175-188.

16. Payton JE, Grieselhuber NR, Chang LW, et al. High throughput digital quantification of mRNA abundance in primary human acute myeloid leukemia samples. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1714-1726.

17. Biagini P. Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;331:21-33.

18. De Vlaminck I, Khush KK, Strehl C, et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell.* 2013;155(5):1178-1187.

19. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(7):589-593.

20. Mwesigwa S, Williams L, Retshabile G, et al; TrypanoGEN Research Group. Unmapped exome reads implicate a role for Anelloviridae in childhood HIV-1 long-term non-progression. *NPJ Genom Med.* 2021;6(1):24.

21. Blatter JA, Sweet SC, Conrad C, et al. Anellovirus loads are associated with outcomes in pediatric lung transplantation. *Pediatr Transplant.* 2018;22(1):e13069.

22. Pan S, Yu T, Wang Y, et al. Identification of a Torque Teno Mini virus (TTMV) in Hodgkin's lymphoma patients. *Front Microbiol.* 2018;9:1680.

23. Bal A, Oriol G, Josset L, et al. Metagenomic investigation of Torque Teno Mini virus-SH in hematological patients. *Front Microbiol.* 2019;10:1898.

DOI 10.1182/blood.2021011677

© 2021 by The American Society of Hematology

Downloaded from http://ashpublications.org/blood/article-pdf/138/18/1777/1832864/bloodbld2021012752.pdf by guest on 17 October 2023

TO THE EDITOR:

COVID-19 as a potential trigger of complement-mediated atypical HUS

Carine El Sissy,[1,2] Antonin Saldman,[1,2] Gilbert Zanetta,[3] Paula Vieira Martins,[1] Coralie Poulain,[4] Raphaël Cauchois,[5] Gilles Kaplanski,[5,6] Jean-Pierre Venetz,[7] Mickaël Bobot,[8] Hélène Dobosziewicz,[9] Laurent Daniel,[10] Marie Koubi,[6] Salima Sadallah,[11] Samuel Rotman,[12] Christiane Mousson,[3] Manuel Pascual,[7] Véronique Frémeaux-Bacchi,[1,2,13] and Fadi Fakhouri[14]

[1]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Immunologie, Paris, France; [2]Paris University, Paris, France; [3]Department of Nephrology-Intensive Care, University Hospital, Dijon, France; [4]Department of Nephrology and Transplantation, Amiens University Hospital, Amiens, France; [5]Hôpitaux de Marseille, CHU de la Conception, Service de Médecine Interne et immunologie clinique, Marseille, France; [6]Assistance Publique–Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Aix-Marseille Université and C2VN, Inserm U1263, Inrae 1260, Marseille, France; [7]Transplantation Center, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland; [8]Hôpitaux de Marseille, Centre de Néphrologie et Transplantation Rénale, CHU de la Conception, Marseille, France; [9]Service de Néphrologie, Dialyse et Transplantation, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), Le Kremlin-Bicêtre, France; [10]Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital de La Timone, AP-HM, Aix-Marseille Université, Marseille, France; [11]Service of Immunology, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland; [12]Service of Clinical Pathology, Lausanne University Hospital, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland; [13]Inflammation, Complement and Cancer Team, Cordeliers Research Center, INSERM Unité Mixte de Recherche (UMR) S1138, Paris, France; and [14]Service of Nephrology and Hypertension, Department of Medicine, Lausanne University Hospital and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

Endothelial cell (EC) injury has emerged as a hallmark of infection resulting from severe respiratory coronavirus 2.[1–3] Complement activation or dysregulation is another notable feature of COVID-19,[4,5] and elevated plasma levels of sC5b-9, a marker of activation of the complement terminal pathway, have been reported in up to 2/3 of COVID-19 patients,[6] and correlate with disease severity.[4,6]

Complement dysregulation is also a well-established pathogenic mechanism of a rare form of renal thrombotic microangiopathy (TMA), the atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS), triggered by complement-induced EC damage.[7]

To date, renal TMA has been very rarely documented in the COVID-19 setting.[8,9] We report on 5 patients with COVID-19-associated renal TMA, among whom 4 tested patients carried complement genetic susceptibility factors for aHUS.

Patients with COVID-19-associated renal TMA were identified using the databases of the French HUS Registry and the

Table 1. Characteristics of 5 patients with COVID-19-associated renal TMA

Pt	Sex, age	NK//RT (nephropathy/ time from RT)	Time from COVID-19 diagnosis to TMA	At TMA diagnosis						Kidney biopsy	COVID-19 treatment	TMA treatment	Follow-up	Outcome
				SCr (mg/dL)	Plt (g/L)	Hb (g/dL)	Hapto. (g/L)	LDH (×ULN)	Puria (g/L)					
1	M, 66 y	NK	0 d	10 (HD)	50	9.2	<0.3	>ULN	NA	Glomerular and arteriolar thrombi and EC detachment. Mild ATN.	—	—	3 mo	HD
2	M, 71 y	RT (NAS/18 mo)	12 d	2.3	16	6.9	<0.3	1.7	1	Kidney biopsy performed 3 wk after TMA resolution Glomerulosclerosis. GBM duplication.	Oxygen (3 L/min)	PE (n = 4) Eculizumab (day 4; n = 3) Temporary discontinuation of tacrolimus/ everolimus.	1 mo	SCr 1.7 mg/dL (baseline values)
3	M, 35y	NK	30 d	1.9/7.9 (HD)	11	9.7	<0.3	9	Oliguria	Glomerular and arteriolar thrombi. Mild ATN.	—	PE (n = 11) Eculizumab (day 13; n = 1)	3 mo	HD
4	F, 26 y	RT (FSGS/3.5 mo)	0 d	7.2 (HD)	22	7.2	<0.3	>ULN	NA	—	—	PE (n = 3) Eculizumab (day 21; ongoing) Temporary tacrolimus discontinuation. Rituximab (n = 2)	4 mo	SCr 4.2 mg/dL Eculizumab continued.
5	F, 38 y	RT (IgAN/24 mo)	10d	3.2	103	10.4	<0.3	1.6	0.8	Extensive EC detachment from GBM. Mesangiolysis.	—	Decrease in tacrolimus dosage.	6 mo	SCr 1.8 mg/dL (baseline values)

ATN, acute tubular necrosis; F, female; FSGS, focal segmental glomerulosclerosis; GBM, glomerular basement membrane; Hapto, haptoglobin; Hb, hemoglobin; HD, hemodialysis; IgAN, immunoglobulin A nephropathy; LDH, lactate dehydrogenase; M, male; NA, not available; NAS, nephroangiosclerosis; NK, native kidneys; PE, plasma exchange; Plt, platelet count; Pt, patient; Puria, proteinuria; RT, renal transplantation; SCr, serum creatinine; ULN, upper limit of normal.

Downloaded from http://ashpublications.org/blood/article-pdf/138/18/1777/1832864/bloodbld2021012752.pdf by guest on 17 October 2023

Table 2. Complement work-up performed in 5 patients with COVID 19-associated renal TMA

Pt	Time from COVID-19 diagnosis (d)	Time from TMA diagnosis (d)	C3 (mg/L)	C4 (mg/L)	sC5b-9 (ng/mL)	FH (%)	FI (%)	CD46 (MFI)	Anti-FH Ab (AU)	CFHR1-CFHR3 copy number	Complement genetics	Complement gene variant classification
1	13	3	840	301	761	70	100	12.3	Negative	1	*CFH* c.2266T>A p.Ser756Thr	Pathogenic (reduced FH plasma level)
2	13	1	1750	332	248	144	147	ND	Negative	1	*C3* c.463A>C p.Lys155Gln	Pathogenic (confers resistance to cofactor activity)[12]
	54	42	1040	187	322	109	130	17	Negative			
3	34	3	1320	415	303	91	66	10.3	Negative (sample collected after PE)	0	*CFI* c.1246A>C p.Ile416Leu	Pathogenic (reduced FI plasma level ; Not detected in supernatants and around 25% expression of WT in lysates)[11]
	108	77	1160	461	1094*	94	86	13.8	Positive (4130)			
	167	136	1050	357	570	112	66	ND	Positive (686)			
4	19	19	1220	454	ND	ND	ND	ND	Positive (1554)	2	*CFH* homozygous tgtgt haplotype	aHUS at-risk haplotype
	42	42	1470	507	345	130	161	ND	Positive (1171)			
	122	122	1210	430	ND	ND	ND	ND	Positive (516)			
5	0	0	1270	550	136	120	120	ND	Negative	ND	ND	ND

Normal range: C3: 615-1250 mg/L; C4: 93-380 mg/L; FH 70%-130%; FI 70%-130%; CD46: 13-19 MFI; sC5b9: <300 ng/mL.

CFH, complement factor H gene; CFHR, complement factor H-related protein; *CFI*, complement factor I; MFI, mean fluorescence intensity; ND, not determined; PE, plasma exchange.

*The patient had several complications related to a perirenal hematoma that occurred after kidney biopsy.

Downloaded from http://ashpublications.org/blood/article-pdf/138/18/1777/1832864/bloodbld2021012752.pdf by guest on 17 October 2023

Complement reference Centre in Lausanne. COVID-19 infection was diagnosed in all cases, based on a positive polymerase chain reaction test for severe respiratory coronavirus 2 in oropharyngeal swab samples. Renal TMA was defined by at least 3 of the following criteria: (1) thrombocytopenia (platelet count <150 g/L), (2) mechanical hemolytical anemia (hemoglobin <10 g/dL, lactate dehydrogenase serum level >upper limit of normal [ULN], undetectable haptoglobin, presence of schistocytes on blood smear), (3) acute kidney injury (serum creatinine and/or proteinuria/creatininuria >ULN for age or an increase >15% compared with baseline), and (4) features of TMA in kidney biopsy.

Measurement of plasma C3, C4, CH50, factors H (FH) and I (FI), sC5b-9, and CD46 expression on granulocytes and tests for anti-FH antibodies were performed as previously described.[10] Screening for variants and complex rearrangements in complement factor H (*CFH*), complement factor I, membrane-cofactor protein, *C3*, and *factor B* genes was performed using next-generation sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification, as previously described.[10] All patients gave informed consent for genetic testing.

Five adult patients with COVID-19-associated renal TMA were identified in 5 French and Swiss nephrology, renal transplantation, and internal medicine units (Table 1; supplemental Figure 1, available on the *Blood* Web site). None had a personal or familial history of aHUS. Three patients were renal transplant recipients and the cause of their end-stage kidney failure was focal segmental glomerulosclerosis, immunoglobulin A nephropathy (n = 1), and nephroangiosclerosis (n = 1). They presented with a COVID-19-associated renal TMA, 3.5 to 24 months after renal transplantation. At TMA onset, they were receiving tacrolimus (n = 3) and everolimus (n = 1) and none had donor-specific antibodies. All patients had mild respiratory symptoms of COVID-19 and only 1 required low-grade oxygen therapy. The interval between COVID-19 diagnosis and TMA diagnosis ranged from 0 to 30 days. Patients 1, 3, and 4 presented with severe hypertension (systolic 163-212 mm Hg; diastolic 92-130 mm Hg). In all cases, renal dysfunction was severe (serum creatinine, 2.3-10 mg/dL) and 3 patients required hemodialysis. Thrombocytopenia was profound with a platelet count ≤50 g/L in 4 patients. Three patients had extrarenal TMA manifestations: neurological symptoms (confusion, central facial palsy) in patient 2 and intestinal involvement (pain, diarrhea) in patients 3 and 4 (documented by intestinal biopsy disclosing capillary thrombi in patient 3). Renal biopsy performed in 3 patients during the acute phase disclosed typical features of TMA (supplemental Figure 2). In patient 3, a biopsy of the kidney transplant performed 3 weeks after TMA resolution showed duplication/wrinkling of the glomerular basement membrane. In all biopsies, no significant immune deposits were detected. All patients had detectable (>20%) ADAMTS13 activity, and polymerase chain reaction for Shiga toxin in stool was negative in tested patients 2 through 4. No patients had evidence of disseminated intravascular coagulation, with normal fibrinogen, prothrombin, and partial thromboplastin time. Tacrolimus trough levels were 20, 9.2, and 5.7 μg/L in patients 2, 4, and 5, respectively.

Complement work-up performed at the time of TMA (Table 2) showed increased plasma C3 and C4 levels in all patients (probably as part of the inflammatory response) and mildly increased sC5b-9 plasma level in 1 patient. FH and FI plasma levels were decreased in 1 patient. Anti-FH antibodies were detected in 2 patients. In 3 of the 4 patients for whom DNA samples were available, a pathogenic rare variant was detected: 1 *CFH* variant known to be associated to decreased plasma FH levels in vivo, 1 complement FI variant associated to a decreased FI synthesis documented in vitro,[11] and 1 *C3* variant associated to an impaired C3 regulation.[12] An additional patient carried, in homozygosity, the haplotype H3 in the *CFH* gene (tgtgt), an established risk factor for aHUS.[7]

Two patients underwent plasma exchanges with fresh frozen plasma, whereas 3 were treated with eculizumab. Patient 4 received 2 infusions of rituximab for anti-FH antibodies. At the last known follow-up (1-6 months), 2 patients remained dialysis-dependent, 2 renal transplant recipients regained their baseline renal function, and a third had a decreased function of the renal transplant.

Data on COVID-19-associated TMA are scarce[9,13,14] (supplemental Table 1). We report here the first series of renal TMA in COVID-19 patients, which includes extensive complement work-up. The first remarkable finding is the sharp contrast between mild respiratory symptoms but severe renal (and in 3 patients extrarenal) TMA. Therefore, COVID-19–related morbidity was mainly due to TMA rather than to the pulmonary involvement. Three of the patients in the present series and 2 from previously published cases are renal transplant recipients. Underlying kidney graft (vascular) damage and tacrolimus/everolimus use and very high trough levels (particularly in patient 2), may have contributed to trigger TMA in the renal graft.

The second remarkable finding is the detection in 3 tested patients of complement gene variants associated to an altered regulation of the complement alternative pathway, and thus to an increased risk of complement-mediated EC injury. An additional tested patient had the at-risk haplotype (H3) in the *CFH* gene, which predisposes to aHUS. Interestingly, the only previously reported patient with COVID-19–associated renal TMA who was tested for complement gene variants, was found to carry a pathogenic rare variant in the *C3* gene and an at-risk haplotype in the membrane-cofactor protein gene.[9] Thus, to date, all 5 reported patients with COVID-19–associated renal TMA, who underwent genetic testing, carry a constitutional complement dysregulation. These findings require confirmation in larger series. Noteworthy, 2 patients were positive for anti-FH antibodies, but the pathogenic relevance of these autoantibodies is unclear, and their presence may reflect the stimulation of the immune system because of COVID-19, rather than a causal role in the TMA.

The discussion of the role of systemic complement activation has been one of the central issues in the management of COVID-19 patients.[6,15–19] Limited preliminary reports suggested a potential benefit of C5 blockade in severe forms of COVID-19,[6,15] but 2 prospective studies did not show any clear benefit of C5 or C5a

Downloaded from http://ashpublications.org/blood/article-pdf/138/18/1777/1832864/bloodbld2021012752.pdf by guest on 17 October 2023

blockade in this setting.[20,21] However, the patients presented here had mild pulmonary COVID-19 manifestations and absent or moderate markers of systemic complement activation. These findings suggest that TMA in our patients resulted predominantly from intrarenal complement activation and ensuing EC damage, associated to a genetic dysregulation of the complement alternative pathway in at least 4 patients (ie, a clinical and genetic pattern of renal TMA similar to the one reported in complement-mediated aHUS). These similarities suggest that HUS is not a unique manifestation of COVID-19, but rather that COVID-19 is a newly identified potential infectious trigger for aHUS, in accordance with previous data on complement-mediated aHUS precipitated by viral infections, mostly influenza strains.[22] The awareness of a potential association of COVID-19 with complement-mediated aHUS may help improve patients' management. The use of anti-complement therapies should be considered in this form of HUS associated with COVID-19, to potentially limit kidney damage. However, the limited number of patients in the present series preclude any firm conclusions, and additional data are required.

In summary, COVID-19 is a potential newly identified trigger for complement-mediated aHUS. The identification of such association has important clinical implications and additional data are required.

Acknowledgment

The authors are grateful to Carole Gengler (Service of Clinical Pathology, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland) for her assistance in reviewing the kidney pathological data.

Authorship

Contribution: C.E.S., V.F.-B., and F.F. reviewed the data and drafted the manuscript; C.E.S., P.V.M., A.S., S.S., and V.F.-B. performed the complement workup; S.R. and L.D. analyzed the kidney biopsies; all the authors were involved in the management of the patients; and all authors read, commented on, and revised the manuscript before approval.

Conflict-of-interest disclosure: G.K. received fees from SOBI and Roche for invited lectures. V.F.-B. has received fees from Alexion Pharmaceuticals, Roche, BioCryps, and Apellis for invited lectures and/or board membership and is the recipient of a research grant from Alexion Pharmaceuticals. F.F. has received consultancy and/or speaker honoraria from Roche, Alexion, Apellis, Achillion, Novartis, and Alnylam. The remaining authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: A.S., 0000-0002-7566-8596; R.C., 0000-0001-9316-5231; M.B., 0000-0002-9451-0372; M.K., 0000-0002-4022-0660; S.R., 0000-0002-2508-3725; C.M., 0000-0003-0861-2506; V.F.-B., 0000-0002-4865-8528.

Correspondence: Fadi Fakhouri, Service of Nephrology and Hypertension, Department of Medicine, Lausanne University Hospital, Rue du Bugnon, Lausanne 1005, Switzerland; e-mail: fadi.fakhouri@unil.ch.

Footnotes

Submitted 3 June 2021; accepted 6 August 2021; prepublished online on *Blood* First Edition 5 September 2021.

Original data are available by e-mail request to the corresponding author.

The online version of this article contains a data supplement.

REFERENCES

1. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(2):120-128.
2. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020;395(10234):1417-1418.
3. Guervilly C, Burtey S, Sabatier F, et al. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial injury in severe COVID -19. *J Infect Dis*. 2020; 222(11):1789-1793.
4. Sinkovits G, Mező B, Réti M, et al. Complement overactivation and consumption predicts in-hospital mortality in SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol*. 2021;12:663187.
5. Yu J, Yuan X, Chen H, Chaturvedi S, Braunstein EM, Brodsky RA. Direct activation of the alternative complement pathway by SARS-CoV-2 spike proteins is blocked by factor D inhibition. *Blood*. 2020;136(18):2080-2089.
6. Peffault de Latour R, Bergeron A, Lengline E, et al; Core Group. Complement C5 inhibition in patients with COVID-19 - a promising target? *Haematologica*. 2020;105(12):2847-2850.
7. Fakhouri F, Zuber J, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 2017;390(10095):681-696.
8. Jhaveri KD, Meir LR, Flores Chang BS, et al. Thrombotic microangiopathy in a patient with COVID-19. *Kidney Int*. 2020;98(2):509-512.
9. Mat O, Ghisdal L, Massart A, et al. Kidney thrombotic microangiopathy after COVID-19 associated with C3 gene mutation. *Kidney Int Rep*. 2021; 6(6):1732-1737.
10. Frémeaux-Bacchi V, Sellier-Leclerc AL, Vieira-Martins P, et al. Complement gene variants and Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome: retrospective genetic and clinical study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019;14(3):364-377.
11. Bienaime F, Dragon-Durey MA, Regnier CH, et al. Mutations in components of complement influence the outcome of Factor I-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. 2010;77(4): 339-349.
12. Seddon JM, Yu Y, Miller EC, et al. Rare variants in CFI, C3 and C9 are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2013;45(11):1366-1370.
13. Bascuñana A, Mijaylova A, Vega A, et al. Thrombotic microangiopathy in a kidney transplant patient with COVID-19. *Kidney Med*. 2021;3(1): 124-127.
14. Jespersen Nizamic T, Huang Y, Alnimri M, Cheng M, Chen LX, Jen KY. COVID-19 Manifesting as Renal Allograft Dysfunction, Acute Pancreatitis, and Thrombotic Microangiopathy: A Case Report. *Transplant Proc*. 2021; 53(4):1211-1214.
15. Annane D, Heming N, Grimaldi-Bensouda L, et al; Garches COVID 19 Collaborative Group. Eculizumab as an emergency treatment for adult patients with severe COVID-19 in the intensive care unit: a proof-of-concept study. *EClinicalMedicine*. 2020;28:100590.
16. Gavriilaki E, Brodsky RA. Severe COVID-19 infection and thrombotic microangiopathy: success does not come easily. *Br J Haematol*. 2020; 189(6):e227-e230.
17. Noris M, Benigni A, Remuzzi G. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact. *Kidney Int*. 2020;98(2):314-322.

Downloaded from http://ashpublications.org/blood/article-pdf/138/18/1777/1832864/bloodbld2021012752.pdf by guest on 17 October 2023

18. Gavriilaki E, Asteris PG, Touloumenidou T, et al. Genetic justification of severe COVID-19 using a rigorous algorithm. *Clin Immunol*. 2021;226: 108726.

19. Carvelli J, Demaria O, Vély F, et al; Explore COVID-19 Marseille Immunopole group. Association of COVID-19 inflammation with activation of the C5a-C5aR1 axis. *Nature*. 2020;588(7836):146-150.

20. Chouaki Benmansour N, Carvelli J, Vivier E. Complement cascade in severe forms of COVID-19: recent advances in therapy. *Eur J Immunol*. 2021;51(7):1652-1659.

21. Vlaar APJ, de Bruin S, Busch M, et al. Anti-C5a antibody IFX-1 (vilobelimab) treatment versus best supportive care for patients with severe COVID-19 (PANAMO): an exploratory, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Rheumatol*. 2020;2(12):e764-e773.

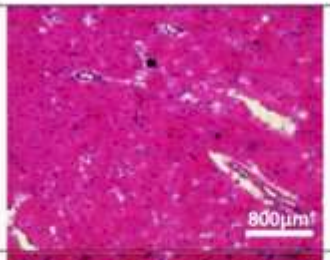
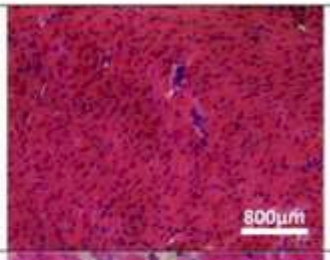
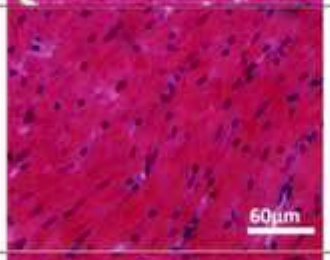
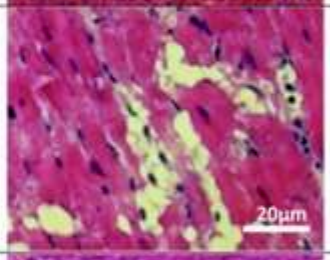
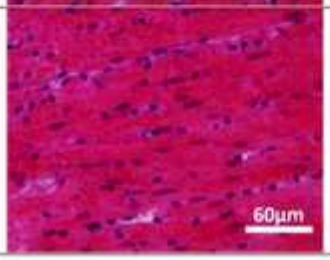
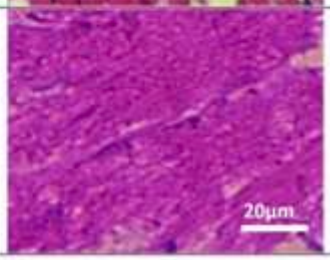
22. Bitzan M, Zieg J. Influenza-associated thrombotic microangiopathies. *Pediatr Nephrol*. 2018;33(11):2009-2025.

DOI 10.1182/blood.2021012752

© 2021 by The American Society of Hematology

Downloaded from http://ashpublications.org/blood/article-pdf/138/18/1777/1832864/bloodbld2021012752.pdf by guest on 17 October 2023

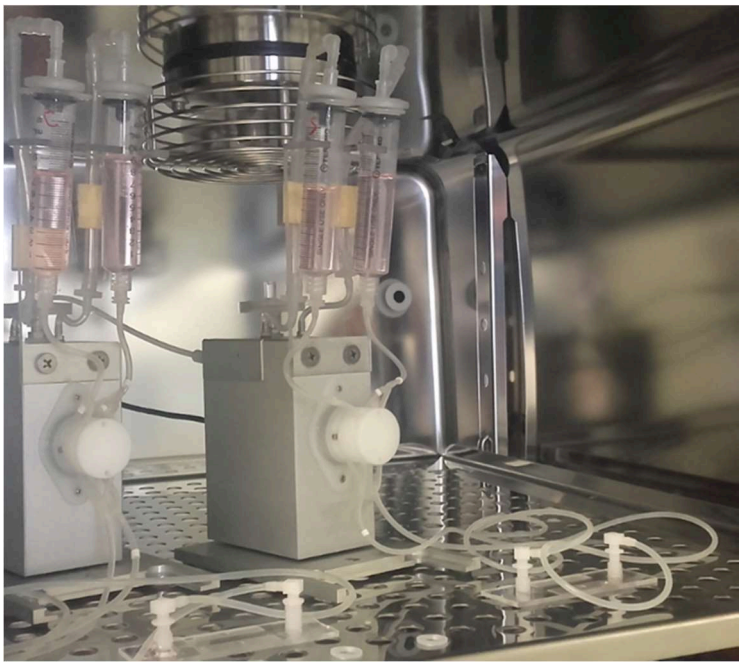
Annexe 4 : score de sévérité histologique

	0	+++
Infiltrate of interstitium		
Myocytolysis and vacuolisation		
Pyknosis or absence of nuclei		

Annexe 5 : Activation endothéliale en conditions de culture dynamique

Méthodes : Culture cellulaire dynamique (en flux)

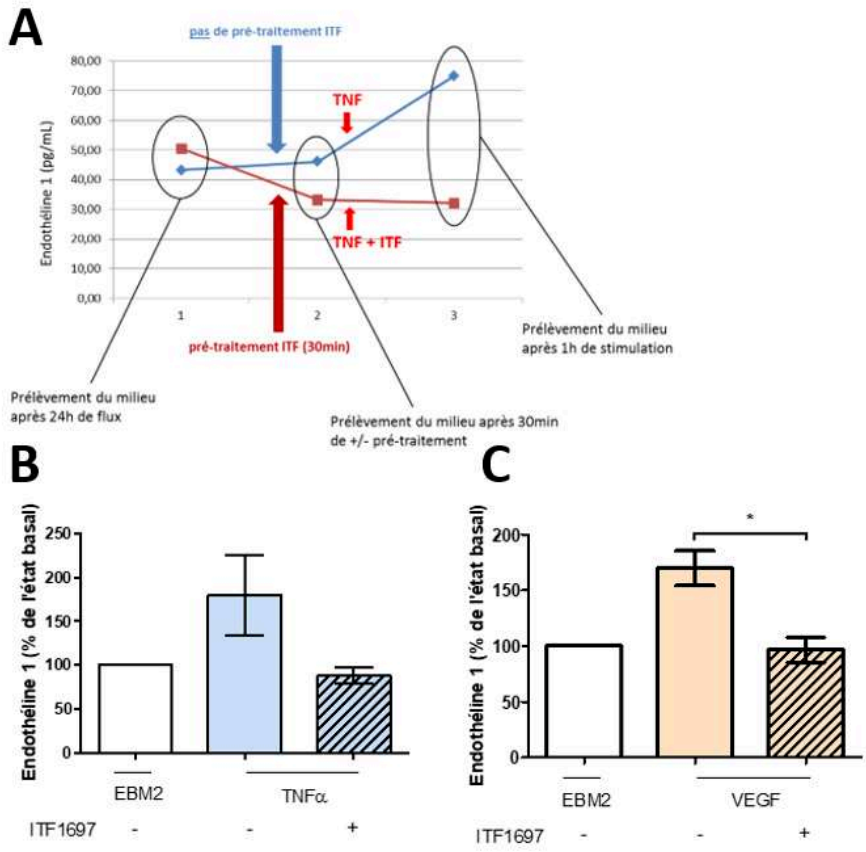
Les µ-slides I Luer 0.4µm (Ibidi GmbH, Germany) sont ensemencées par 100µL contenant des HUVEC à la concentration de 1.5M cellules/mL. Elles sont laissées pendant 16h en condition de culture statique, et le flux unidirectionnel est lancé après vérification d'une confluence > 80%. Une pompe Ibidi est contrôlée par le logiciel Pump Control. Le shear stress (force de cisaillement) utilisé est de 4 dyn/cm², correspondant à une pression constante de 27.9 mbar au niveau des réservoirs des unités fluidiques. Au bout de 24h de flux unidirectionnel d'EGM2 dans la chambre de chaque µ-slide, les cellules sont prétraitées ou non par 100µg/mL d'ITF1697 pendant 30 minutes. Puis elles sont activées pendant 1h par adjonction d'activateurs endothéliaux, VEGF 2ng/mL ou plasmas PTT (dilués au 1/100ème) dans les réservoirs des unités fluidiques en présence ou pas d'ITF1697. Enfin le milieu de culture est récupéré pour dosage de l'endothéline-1 (kit ELISA R&D Bio-Techne), selon les recommandations du fournisseur).



Chambre à flux dans l'incubateur en culture cellulaire

Effet de l'ITF1697 sur la libération de l'endothéline-1 en condition de culture dynamique (résultats préliminaires)

Pour nous rapprocher de la physiologie endothéliale, nous avons réalisé des dosages de l'endothéline-1 dans le milieu de culture des HUVEC soumises à un flux unidirectionnel et stimulées par les activateurs précédemment décrits. En condition dynamique, le prétraitement par ITF1697 inhibe fortement la dégranulation induite par le TNFα à 50ng/mL (panel B, n=2, pas de test statistique réalisé) et par le VEGF à 2ng/mL (panel C, n=3, d'inhibition, $p<0,05$). Le panel A illustre les différents points de dosage d'endothéline-1 réalisés en condition de culture dynamique. On notera que la quantification de l'expression du vWF en immunofluorescence était impossible compte tenu du fait d'un bruit de fond très élevé.

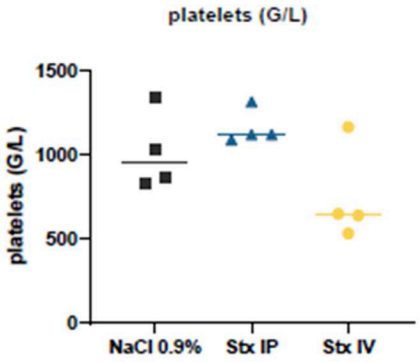


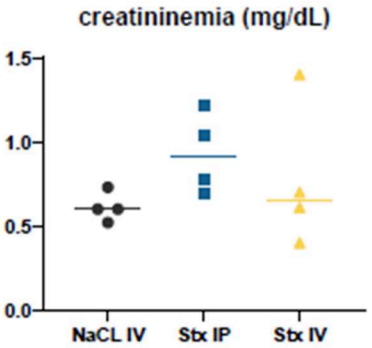
Effet de l'ITF1697 sur la libération d'endothéline 1 en condition de culture dynamique. HUVEC à confluence dans des microslides et dans des conditions de flux pendant 24h (shear stress = 4 dyn/cm²). **(A)** exemple d'évolution des taux d'endothéline-1 dans les conditions avec et sans ITF1697 lors de la stimulation par TNFα. **(B)** Activation cellulaire par adjonction de TNFα (50ng/mL) pendant 1h dans les réservoirs des unités fluidiques avec ou sans prétraitement par ITF1697 (100µg/mL) pendant 30 min. Normalisation de l'EMB2 à 100% (correspondant au point après 24h de flux). **(C)** adjonction de VEGF à 2ng/mL, avec ou sans ITF1697 selon les mêmes modalités (n=3, $p<0,05$).

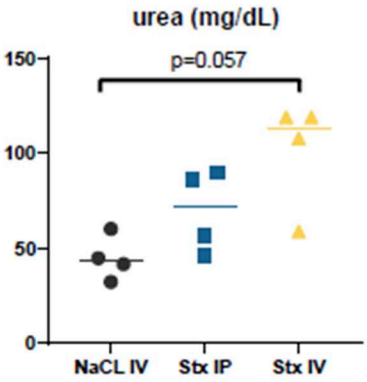
Annexe 6 : Echecs d'induction du PTT par différents activateurs

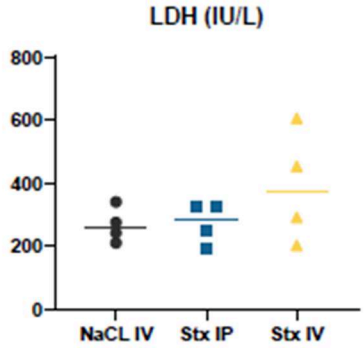
Modèle de SHU « aigu » :

Protocole : injection de Shigatoxine 2 à des souris KO ADAMTS13 (300 pg/g à J0), voie IP vs IV, et analyse des plaquettes + urée + créatinine et LDH à J3



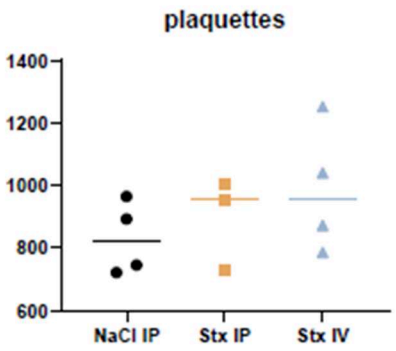


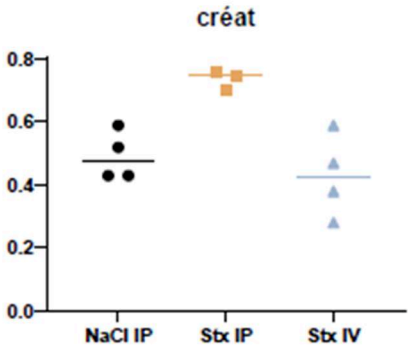


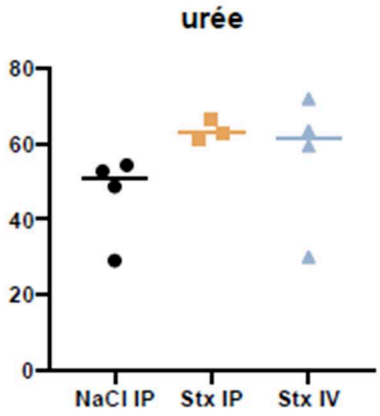


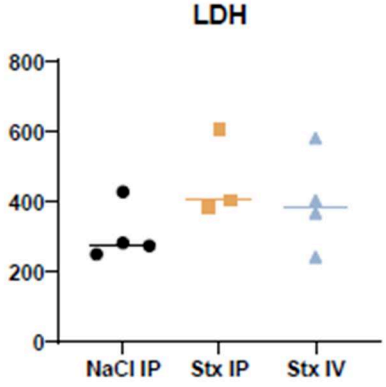
Modèle de SHU « subaigu » :

Protocole : injection de Shigatoxine 2 à des souris KO ADAMTS13 (100 pg/g à J0, J3, J6) par voie IP, et analyse des plaquettes à J7



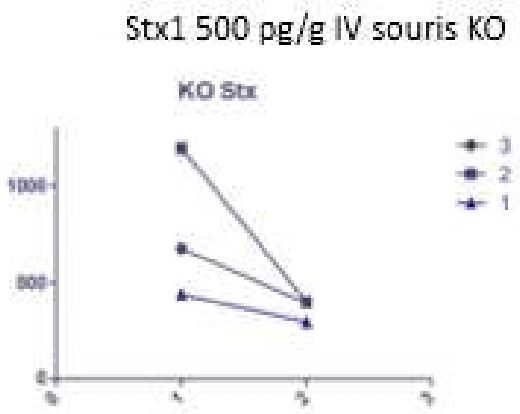


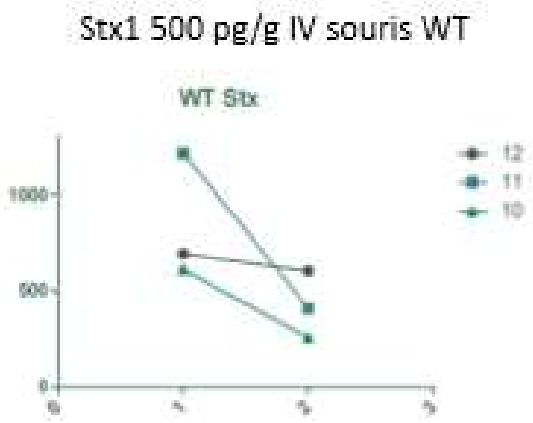


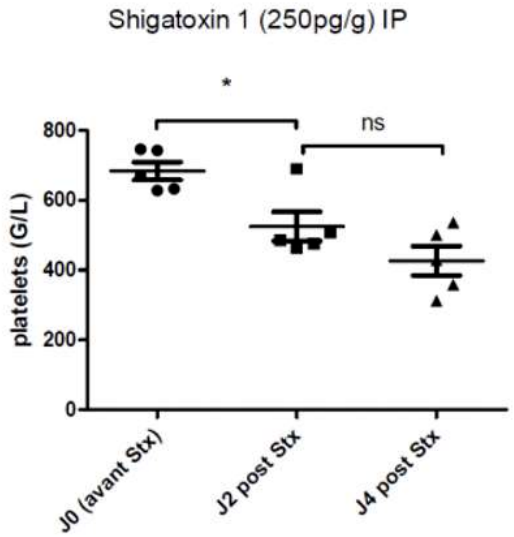


Shigatoxine 1

Utilisation de la Shigatoxine 1 à forte dose (500 pg/g) chez des souris KO et des souris WT, et utilisation de la Shigatoxine 1 en « régime séquentiel » (250 pg/g à J0 J2 J4). En ordonnée, le dosage des plaquettes.

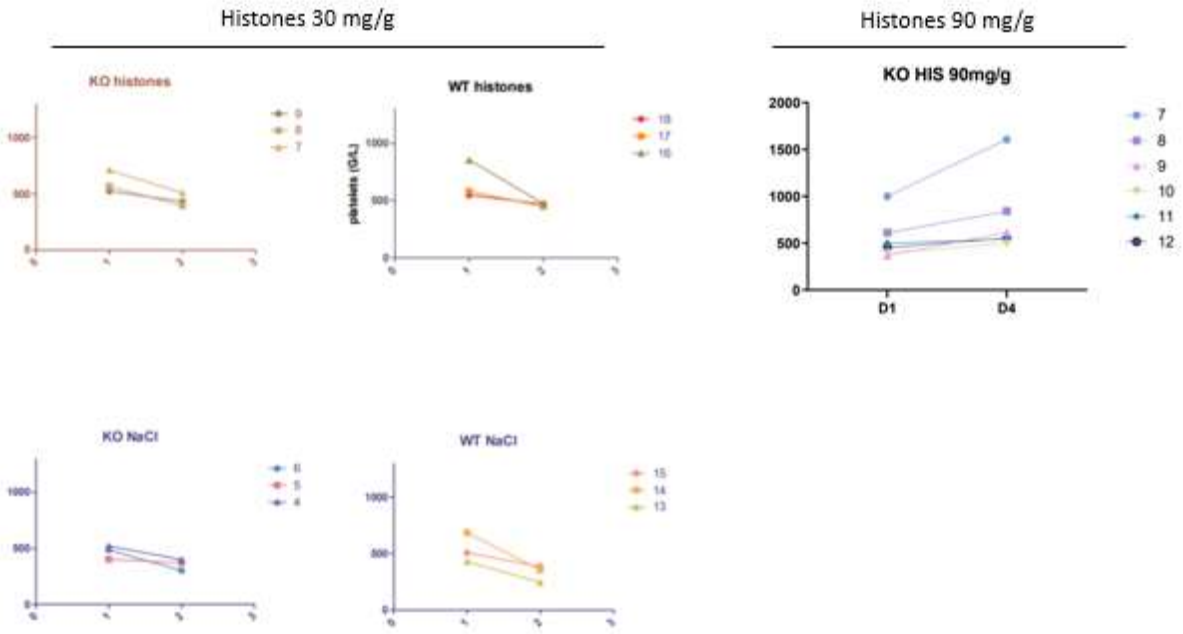




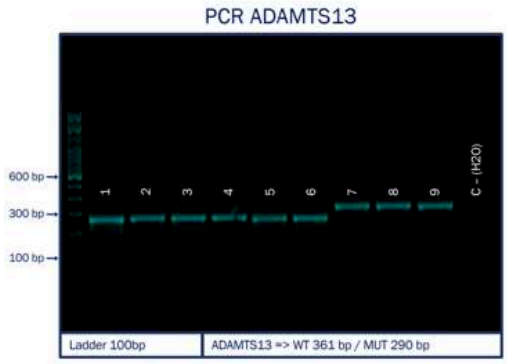


Les histones n'induisent pas de thrombopénie marquée

Administration d'histones (H3, H5505, Sigma Aldrich) à la posologie de 30 mg/g de souris à des souris et WT (injection à J0, dosage plaquettes à J1), et à la posologie de 90 mg/g à des souris KO (injection J0, dosage J3). En ordonnée, le dosage des plaquettes.



Annexe 7 : génotypage des souris



ÉCHANTILLON	RÉSULTATS		
	WILD TYPE	KO HOMO	HETEROZYGOTE
1		+	
2		+	
3		+	
4		+	
5		+	
6		+	
7	+		
8	+		
9	+		

Génotypage des souris par PCR avec confirmation de l'invalidation bi-allélique du gene *adamts13* chez les souris 1 à 6

Annexe 8 : Guervilly *et al*, JID 2020

The Journal of Infectious Diseases

Circulating Endothelial Cells as a Marker of Endothelial Injury in Severe COVID -19

Christophe Guervilly,[1,2] Stephane Burtey,[3,4] Florence Sabatier,[4,5,6] Raphaël Cauchois,[4,7] Guillaume Lano,[3,4] Evelyne Abdili,[5] Florence Daviet,[3] Laurent Arnaud,[5] Philippe Brunet,[3,4] Sami Hraiech,[1,2] Noémie Jourde-Chiche,[3,4] Marie Koubi,[7] Romaric Lacroix,[4,5] Léa Pietri,[8] Yaël Berda,[5] Thomas Robert,[3,4] Clara Degioanni,[6] Mélanie Velier,[4,5] Laurent Papazian,[1,2] Gilles Kaplanski,[4,7] and Françoise Dignat-George[4,5]

[1]Medical Intensive Care Unit, North Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France, [2]Center for Studies and Research on Health Services and Quality of Life, Aix-Marseille University, Marseille, France, [3]Department of Nephrology and Renal Transplantation, La Conception Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France, [4]Aix-Marseille University, INSERM 1263, INRAE, C2VN, Marseille, France, [5]Laboratory of Hematology and Vascular Biology, La Conception Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France, [6]Cell Therapy Unit, INSERM CBT1409, La Conception Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France, [7]Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, La Conception Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France, and [8]Department of Nutrition, Metabolic Diseases, Endocrinology, La Conception Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

Beside the commonly described pulmonary expression of the coronavirus disease 2019 (COVID-19), major vascular events have been reported. The objective of this study was to investigate whether increased levels of circulating endothelial cells (CECs) might be associated with severe forms of COVID-19. Ninety-nine patients with COVID-19 were enrolled in this retrospective study. Patients in the intensive care units (ICU) had significantly higher CEC counts than non-ICU patients and the extent of endothelial injury was correlated with putative markers of disease severity and inflammatory cytokines. Together, these data provide in vivo evidence that endothelial injury is a key feature of COVID-19.

Keywords. circulating endothelial cells; COVID-19; endothelial injury.

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has become a global threat to public health, affecting more than 4 million individuals worldwide. COVID-19 patients are usually mildly symptomatic, but in 20% of them the disease will evolve towards viral pneumonia, and among them, 5% will experience an atypical form of acute respiratory distress syndrome [1]. SARS-CoV-2 binds to angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), which is highly expressed in the lungs. ACE2 is also expressed by the endothelium [2], one of the largest organs in the human body. Moreover, cardiovascular complications [3], consisting of strokes, pulmonary embolisms, high blood pressure, vasculitis, and Kawasaki-like disease [4], are emerging as severe COVID-19 symptoms, suggesting that endothelial injury could constitute a key pathogenic mechanism. Despite widespread interest in the pathophysiology of the disease, little is known about the involvement of the endothelium during the course of COVID-19.The vascular endothelium is a dynamic organ that plays key roles in vascular homeostasis, such as maintaining vascular tone, permeability, and inflammatory response, preserving the hemostatic balance. Any endothelial injury, including infections, impairs regulatory functions of the endothelium with subsequent vasoconstriction, ischemia, inflammation, and activation of the coagulation cascade, ultimately leading to vessel denudation and exposure of the thrombogenic subendothelium [5].

Circulating endothelial cells (CECs) are stressed cells detached from injured vessels [6]. They are detectable at very low levels in healthy conditions. Increased CEC counts have been reported in various diseases of inflammatory, infectious, or ischemic origin, where they evidence a profound vascular insult and are indicative of disease severity [6]. The objective of the present study was to measure CECs in the blood of patients with COVID-19 in relation to systemic inflammation and disease severity.

METHODS

Patients

Ninety-nine adult patients with COVID-19 were enrolled in a retrospective study approved by a local medical ethics committee of Aix-Marseille University. Written informed consent was obtained from the patients or their relatives. COVID-19 was diagnosed when patients presented with viral pneumonia associated with objective findings on lung computed tomography scan or chest X-ray, and infection was confirmed by positive SARS-CoV-2 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in nasopharyngeal swab, sputum, or bronchoalveolar lavage. Patients were hospitalized either in the COVID-19 medicine or nephrology units (non-ICU) or in an intensive care unit (ICU), depending on the severity of their oxygen requirements. Blood samples were collected within 48 hours of patient admission.

Quantification of CECs, Soluble Endothelial Cell Adhesion Molecules, and Inflammatory Cytokines

CECs were counted according to a previously published standardized protocol [6]. Briefly, CECs were isolated by immunomagnetic separation with beads (Dynabeads

Received 5 June 2020; editorial decision 12 August 2020; accepted 18 August 2020; published online August 19, 2020.

Correspondence: Prof Françoise Dignat-George, Aix-Marseille University, INSERM 1263, INRAE, C2VN, 27 Bd Jean Moulin 13005 Marseille, France (Francoise.dignat-george@univ-amu.fr).

The Journal of Infectious Diseases® 2020;222:1789–93

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jiaa528

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/222/11/1789/5894144 by guest on 17 October 2023

M-450; Thermo Fisher) coated with CD146 (clone S-endo1; Biocytex) and enumerated using a fluorescence microscope (Eclipse TE2000-S; Nikon) after acridine orange labeling. CECs were identified according to the following consensus criteria: stained rosette cells, size over 15 μm, and bearing more than 5 beads.

Plasma (EDTA) levels of soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM-1) and E-selectin (sE-selectin), and serum levels of interferon-γ–induced protein 10 (IP-10) and interleukin-6 (IL-6) were quantified by magnetic Luminex assay (Bio-Techne).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 15.0 software. Categorical variables were presented as frequencies, and continuous variables were presented as the median (25–75 percentiles). Comparisons between groups were performed using Mann-Whitney test for quantitative variables and Fisher exact tests for frequencies. Associations between continuous variables were analyzed using Spearman correlation tests. Multiple linear regression was performed to determine the impact of cardiovascular risk factors and comorbidities on CEC levels. Statistical significance was defined as $P < .05$.

RESULTS

Patients' characteristics are reported in Table 1. The non-ICU patients were older and less frequently obese than the patients in the ICU. The prevalence of other comorbidities was higher in the non-ICU patients. During their stay in the ICU, all patients needed invasive mechanical ventilation. At inclusion, ICU patients had more severe lymphopenia and higher levels of leukocytes, neutrophils fibrinogen, C-reactive protein, and lactate dehydrogenase than non-ICU patients.

Measurement of CECs revealed that 55% of patients had CEC counts above 20 cells/mL, considered to be the upper limit of normal values. CEC count was significantly higher in ICU patients than in non-ICU patients (49 CEC/mL [25–75 percentile, 24–103] vs 18 [25–75 percentile, 6–70] CEC/mL, respectively; $P = .03$; Figure 1A). CEC counts were negatively correlated with platelet and lymphocyte counts ($r = -0.334$, $P = .0008$ and $r = -0.336$, $P = .0007$, respectively; Figure 1B), previously identified as COVID-19 severity markers [7]. Interestingly, a positive correlation between the CEC counts and the length of hospital stay ($r = 0.261$, $P = 0.02$) was observed.

The plasma concentrations of the inflammatory cytokines IL-6 and IP-10, and of 2 inflammation-induced endothelial adhesive molecules, E-selectin and sVCAM-1, were significantly higher in ICU patients than non-ICU patients (Table 1). CEC counts were correlated with sVCAM-1 ($r = 0.374$, $P = .0002$) and IP-10 concentrations ($r = 0.487$, $P < .0001$; Figure 1C) but not with sE-selectin and IL-6 concentrations.

Finally, we analyzed the relationship between CEC count, comorbidities, and cardiovascular risk factors in patients with COVID-19. In univariate analysis, increased CEC levels were associated with chronic kidney disease (CKD) but not with high blood pressure, diabetes, age, obesity, or CVD. Multivariate analysis integrating age, obesity, hypertension, CKD, cardiovascular disease, and ICU hospitalization, indicated that among comorbidities factors only CKD could be identified as independently associated with CEC counts ($P = .011$). Admission to the ICU was also associated with high CEC levels independently of all comorbidities that differed between ICU and non-ICU patients ($P = .046$). Consequently, after the exclusion of patients with CKD, the difference between CEC levels in ICU patients compared to non-ICU patients was even more pronounced ($P = .002$; Figure 1A).

DISCUSSION

This is the first observation of increased CEC counts in the blood of patients with COVID-19. CEC counts were significantly higher in patients admitted to the ICU, positively correlated with the length of hospital stay, and were inversely correlated with platelet and lymphocyte counts. Increased CEC levels were also associated with increased concentrations of the cytokine IP-10 and sVCAM-1. These results provide in vivo evidence that a marked and widespread endothelial injury occurred in the course of proinflammatory vessel activation in the more severe forms of COVID-19.

It has been reported that CEC levels are increased in patients with cardiovascular risk factors [6]. Although our cohort showed a high prevalence of various comorbidities, CKD was the only condition identified as a major determinant of elevated CEC counts in patients with COVID-19. Consistently, previous studies have indicated that an increased CEC count is a marker of endothelial dysfunction with pejorative prognosis value in hemodialysis patients [8]. Thus, in addition to reflecting preexisting vascular dysfunction associated with typical risk factors, a rise in CEC counts in COVID-19 patients could be indicative of the acute deleterious impact of the disease process itself. However, CKD, which is increasingly recognized as a risk factor for severe COVID-19 development, may favor endothelial vulnerability.

Endothelial involvement across different vascular beds was shown in recent postmortem histopathological observations of COVID-19 patients with multisystem organ failure. Ultrastructural damage, including disruption of intercellular junction, cell swelling, and a loss of contacts with the basal membrane, were associated with accumulation of inflammatory cells together with the presence of apoptotic bodies and viral inclusion structures in endothelial cells, recapitulating features of endotheliitis [9, 10]. This suggests that both viral infection of endothelial cells and inflammation-induced microangiopathy could contribute to cell detachment and elevated CEC counts.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/222/11/1789/5894144 by guest on 17 October 2023

Table 1. Baseline Demographics, Treatments, Biological Parameters, and Outcomes of the Study Patients

Characteristic	Non-ICU Patients	ICU Patients	*P* Value
Demographic information			
Total No.	80	19	…
Age, y, median (25–75 percentile)	68.2 (57.7–80.3)	55.3 (43.3–60.7)	.0001
Sex male/female	44/36	12/7	NS
Cardiovascular risk factors, n (%)			
Obesity[a]	15 (19)	9 (47)	.01
Chronic kidney disease[b]	28 (35)	0 (0)	.001
Stage 3	9 (11)	0 (0)	…
Stage 4	1 (1)	0 (0)	…
stage 5D	18 (23)	0 (0)	…
Hypertension	43 (54)	4 (21)	.01
Diabetes	20 (25)	4 (21)	NS
Cardiovascular disease, n (%)	24 (30)	0 (0)	.005
Chronic respiratory disease, n (%)			
Asthma	1 (1)	2 (11)	NS
Chronic obstructive pulmonary disease	3 (4)	0 (0)	NS
Clinical data at admission and treatments received during stay			
Oxygen saturation, %, median (25–75 percentile)	96 (94–97)	86.5 (81–93)	<0.0001
Received supplemental oxygen, n (%)	64 (80)	19 (100)	0.04
Invasive mechanical ventilation, n (%)	NA	19 (100)	…
Extra corporeal membrane oxygenation, n (%)	NA	8 (42)	…
Antiviral treatment, n (%)			
Hydroxychloroquine + azithromycin	58 (73)	12 (63)	NS
Lopinavir + ritonavir	0 (0)	5 (26)	.0002
None	22 (28)	2 (11)	NS
Outcomes			
28-day mortality, n (%)	3 (3)	0 (0)	NS
Transferred into ICU, n (%)	13 (16.3)	NA	…
Total length of hospital stay at study end-point of alive discharged patients, d, median (25–75 percentile)	14 (9–18)	27 (23–34)	.0001
Hospital discharged at 28 d, n (%)	70 (88)	6 (31)	<.0001
Laboratory results at inclusion, median (25–75 percentile)			
White blood cell count $\times 10^9$/L	5.7 (4.6–7.3)	6.7 (5.6–12.0)	.04
Neutrophil $\times 10^9$/L	3.8 (2.8–5.3)	6.1 (4.2–10.1)	.002
Lymphocyte $\times 10^9$/L	1.2 (0.8–1.8)	0.9 (0.7–1.1)	.02
Platelet count $\times 10^9$/L	272 (195–317)	240 (188–310)	NS
Fibrinogen, g/L	5.7 (4.8–7.5)	6.8 (6.4–7.8)	.04
D-dimer, ng/mL	1.6 (0.8–2.1)	2.5 (1.4–4.7)	NS
C-reactive protein, mg/L	49 (19–89)	125 (91–179)	.004
Lactate dehydrogenase, U/L	291 (224–344)	473 (376–640)	<.0001
Creatinine, µmol/L[c]	71 (51–102)	66 (57–80)	NS
CEC, n/mL	18 (6–70)	49 (24–103)	.03
Soluble endothelial markers			
sVCAM-1, ng/mL	1700 (1135–2992)	2532 (1902–4795)	.04
sE-selectin, ng/mL	25 (20–36)	39 (31–58)	.008
Cytokines			
IP-10, pg/mL	89 (53–211)	227 (134–336)	.001
IL-6, pg/mL	25 (13–48)	93 (44–142)	.0003

Abbreviations: CEC, circulating endothelial cells; ICU, intensive care unit; IL-6, interleukin 6; IP-10, interferon γ-induced protein 1; NA, not applicable; NS, nonsignificant; sE-selectin, soluble E- selectin; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule 1.

[a]Obesity was defined as a body mass index > 30 kg/m^2.

[b]Chronic kidney disease was defined as an estimated glomerular filtration rate < 60 mL/min/1.73 m^2 or requirement for hemodialysis for more than 3 months.

[c]Hemodialyzed patients were excluded.

Indeed, other coronaviruses are cytopathic [11] and potent inducers of the intracytoplasmic NLRP3 inflammasome, known to control pyroptosis and to play a role in endothelial detachment in Kawasaki disease [12], a disease recently associated with the COVID-19 spectrum [4]. Excessive activation of the NLRP3 inflammasome, triggering IL-6 and interferon-γ

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/222/11/1789/5894144 by guest on 17 October 2023

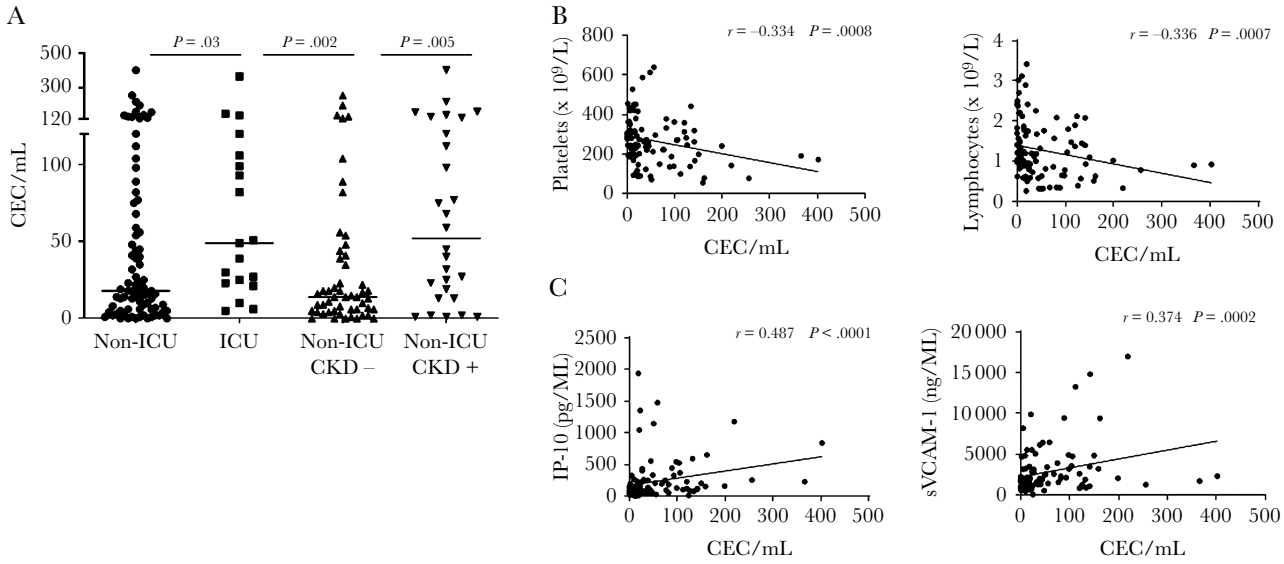


Figure 1. CEC enumeration in patients with COVID-19. *A*, CEC/mL values in non-ICU patients (n = 80), ICU patients (n = 19), non-ICU non-CKD patients (non-ICU CKD –, n = 52), and patients with CKD (non-ICU CKD +, n = 28). *B*, Correlations between CEC count and platelets and lymphocytes. *C*, Correlations between CEC count and IP-10 and sVCAM-1. Abbreviations: CEC, circulating endothelial cells; CKD, chronic kidney disease; COVID-19, coronavirus disease 2019; ICU, intensive care unit; IP-10, interferon γ-induced protein 10; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1.

(IFN-γ) production, may also mediate a severe inflammatory endothelial cell response. Consistent with the cytokine storm involved in the severe forms of COVID-19 [13], we found that CEC counts were positively correlated with the concentrations of IP-10 and sVCAM-1, known to be induced by IFN-γ. This suggests that the cytokine storm plays an important role in the endothelial cell monolayer disruption during SARS-CoV-2 infection, as already reported in other viral diseases [14]. Loss of adhesive contact of infected endothelial cells, involving inflammatory cytokines or leukocytes-derived proteases, has also been documented during herpes simplex virus or cytomegalovirus infection [6, 15].

Markers enabling stratification of the progression of COVID-19 are helpful to improve the management of patients. Interestingly, we found that the CEC levels in COVID-19 patients were inversely correlated with lymphocytes and platelets counts, recognized as prognostic factors for early identification of severe COVID-19 cases [8]. CEC counts were also correlated with the length of hospital stay. Thus, CEC levels could be proposed as a noninvasive and specific biomarker to quantify endothelial injury associated with the exacerbated inflammatory host response that characterizes severe COVID-19.

There are some limitations to this study. The small sample size and the overall low mortality rate limited the evaluation of the prognostic value of CECs, notably for the prediction of cardiovascular complications. In addition, because serial blood samples were not available, future studies are required to investigate CEC kinetics and its relationship with COVID-19 evolution and therapeutic interventions.

In conclusion, increased CEC counts provide a direct proof of endothelial damage during the course of COVID-19 and a clinically informative biomarker of disease severity. The data may also provide rationale for therapies that stabilize the endothelium, in addition to limiting inflammation, in vulnerable patients. Future longitudinal studies are required to define the usefulness of CECs as a noninvasive vascular biomarker for risk stratification and response to treatment.

Notes

Acknowledgments. We thank Patricia Berenger, Cécile Daou, and Léa Plantureux for their technical help. We are also grateful to the many front-line medical and technical staff for their dedication in the face of this outbreak, despite the potential threat to their own lives and the lives of their families.

Financial support. This work was supported by Aix-Marseille University, INSERM, and Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille.

Potential conflicts of interest. F. D. G. and R. L. report grants from Stago and a patent on microvesicle fibrinolytic activity licensed to Stago. C. G. reports personal fees from XENIOS FMC Inc. S. B. reports personal fees from Otsuka, Bayer, and Sanofi. These are all outside the submitted work. All other authors report no potential conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/222/11/1789/5894144 by guest on 17 October 2023

References

1. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City Area. JAMA **2020**; 323:2052–9.
2. Khan S, Taverna F, Rohlenova K, et al. EndoDB: a database of endothelial cell transcriptomics data. Nucleic Acids Res **2019**; 47:D736–44.
3. Liu PP, Blet A, Smyth D, Li H. The science underlying COVID-19: implications for the cardiovascular system. Circulation **2020**; 142:68–78.
4. Jones VG, Mills M, Suarez D, et al. COVID-19 and Kawasaki disease: novel virus and novel case. Hosp Pediatr **2020**; 10:537–40.
5. Godo S, Shimokawa H. Endothelial functions. Arterioscler Thromb Vasc Biol **2017**; 37:e108–14.
6. Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, et al. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. Thromb Haemost **2005**; 93:228–35.
7. Zhang J, Yu M, Tong S, et al. Predictive factors for disease progression in hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. J Clin Virol **2020**; 127:104392.
8. Koc M, Richards HB, Bihorac A, et al. Circulating endothelial cells are associated with future vascular events in hemodialysis patients. Kidney Int **2005**; 67:1078–83.
9. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. Lancet **2020**; 395:1417–8.
10. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19. N Engl J Med **2020**; 383:120–8.
11. Yue Y, Nabar NR, Shi CS, et al. SARS-coronavirus open reading frame-3a drives multimodal necrotic cell death. Cell Death Dis **2018**; 9:904.
12. Jia C, Zhang J, Chen H, et al. Endothelial cell pyroptosis plays an important role in Kawasaki disease via HMGB1/RAGE/cathespin B signaling pathway and NLRP3 inflammasome activation. Cell Death Dis **2019**; 10:778.
13. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. Nat Rev Immunol **2020**; 20:363–74
14. Bonney S, Seitz S, Ryan CA, et al. Gamma interferon alters junctional integrity via rho kinase, resulting in blood-brain barrier leakage in experimental viral encephalitis. mBio **2019**; 10:e01675-19.
15. Percivalle E, Revello MG, Vago L, et al. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. J Clin Invest **1993**; 92:663–70.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/222/11/1789/5894144 by guest on 17 October 2023

Annexe 9 : Guervilly *et al*, Blood Advance 2020

STIMULUS REPORT

blood advances

Dissemination of extreme levels of extracellular vesicles: tissue factor activity in patients with severe COVID-19

Christophe Guervilly,[1,2] Amandine Bonifay,[3,4] Stephane Burtey,[3,5] Florence Sabatier,[3,4,6] Raphaël Cauchois,[3,7] Evelyne Abdili,[4] Laurent Arnaud,[4] Guillaume Lano,[3,5] Léa Pietri,[8] Thomas Robert,[3,5] Mélanie Velier,[3,4] Laurent Papazian,[1,2] Jacques Albanese,[9] Gilles Kaplanski,[3,7] Françoise Dignat-George,[3,4] and Romaric Lacroix[3,4]

[1]Medical Intensive Care Unit, North Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Chemin des Bourrely, Marseille, France; [2]Center for Studies and Research on Health Services and Quality of Life, EA3279 Research Unit, Aix-Marseille University, Marseille, France; [3]Aix Marseille University, INSERM 1263, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE), Centre de Recherche en CardioVasculaire et Nutrition (C2VN), Marseille, France; [4]Laboratory of Hematology and Vascular Biology, [5]Department of Nephrology and Renal Transplantation, [6]Cell Therapy Unit, INSERM Centre d'Investigations Cliniques en Biothérapie (CBT) 1409, [7]Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, and [8]Department of Nutrition, Metabolic Diseases, and Endocrinology, La Conception Hospital, and [9]Intensive Care Unit, Centre Hospitalier Universitaire La Timone, AP-HM, Marseille, France

Key Points

- EV-TF activity is dramatically increased in patients with severe COVID-19 and is associated with an increased thrombotic risk.
- Compared with patients with septic shock, those with severe COVID-19 display a distinct EV profile with higher procoagulant activity.

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) has become one of the biggest public health challenges of this century. Severe forms of the disease are associated with a thrombo-inflammatory state that can turn into thrombosis. Because tissue factor (TF) conveyed by extracellular vesicles (EVs) has been implicated in thrombosis, we quantified the EV-TF activity in a cohort of hospitalized patients with COVID-19 (n = 111) and evaluated its link with inflammation, disease severity, and thrombotic events. Patients with severe disease were compared with those who had moderate disease and with patients who had septic shock not related to COVID-19 (n = 218). The EV-TF activity was notably increased in patients with severe COVID-19 compared with that observed in patients with moderate COVID-19 (median, 231 [25th to 75th percentile, 39-761] vs median, 25 [25th to 75th percentile, 12-59] fM; $P < .0001$); EV-TF was correlated with leukocytes, D-dimer, and inflammation parameters. High EV-TF values were associated with an increased thrombotic risk in multivariable models. Compared with patients who had septic shock, those with COVID-19 were characterized by a distinct coagulopathy profile with significantly higher EV-TF and EV-fibrinolytic activities that were not counterbalanced by an increase in plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Thus, this article is the first to describe the dissemination of extreme levels of EV-TF in patients with severe COVID-19, which supports the international recommendations of systematic preventive anticoagulation in hospitalized patients and potential intensification of anticoagulation in patients with severe disease.

Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) global pandemic caused by the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has become one of the biggest public health challenges of this century. Patients with COVID-19 are usually mildly symptomatic; however, a severe form of the disease will develop in 5% of patients, causing acute respiratory distress syndrome, which has a high mortality rate.[1] Severe COVID-19 is associated with a prothrombotic state[2,3] with unique characteristics compared with a more classical sepsis-induced coagulopathy. This is reflected by a sharp increase in D-dimer and fibrinogen but initial minimal abnormalities in the prothrombin time (PT) and platelet counts.[4] Despite preventive

Submitted 31 August 2020; accepted 13 November 2020; published online 29 January 2021. DOI 10.1182/bloodadvances.2020003308.

To request data, please contact the corresponding author Françoise Dignat-George by e-mail at francoise.dignat-george@univ-amu.fr.

The full-text version of this article contain a data supplement.

© 2021 by The American Society of Hematology

Downloaded from http://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/5/3/628/1798579/advancesadv2020003308.pdf by guest on 30 January 2021

Table 1. Characteristics of patients with severe or moderate forms of COVID-19 and patients with and without TEEs

Characteristic	Moderate COVID-19	Severe COVID-19	*P*	TEE-negative	TEE-positive	*P*
Total no. of patients	73	38		100	11	
Age, y	69 [57-80]	56 [52-70]	.003	68 [55-80]	50 [37-58]	.003
Sex			.318			.213
Male	36	23		51	8	
Female	37	15		49	3	
Cardiovascular risk factors						
Obesity	14 (19)	11 (29)	.215	20 (20)	5 (45)	.116
Chronic kidney disease	21 (29)	8 (21)	.495	28 (28)	1 (9)	.282
Hypertension	40 (55)	14 (37)	.109	51 (51)	3 (27)	.204
Diabetes	21 (29)	6 (16)	.165	24 (24)	3 (27)	.727
Cardiovascular disease	24 (33)	9 (24)	.384	32 (32)	1 (9)	.169
Clinical data at admission and treatments received during hospital stay						
Oxygen saturation, %	97 [94-98]	94 [79-96]	<.0001	96 [94-98]	85 [70-94]	.001
Received supplemental oxygen	38 (52)	38 (100)	<.0001	65 (65)	11 (100)	.016
Invasive mechanical ventilation	NA	18 (47)		2 (2)	9 (82)	<.0001
Extra corporeal membrane oxygenation	NA	8 (21)		1 (1)	7 (64)	<.0001
Anticoagulation therapy						
Heparin (preventive dose)	50 (69)	13 (34)	.001	62 (62)	1 (9)	.001
Heparin (treatment dose)	0 (0)	18 (47)	<.0001	8 (8)	10 (91)	<.0001
Direct oral anticoagulants	9 (12)	1 (3)	.084	10 (10)	0 (0)	.336
Anti-vitamin K	5 (7)	1 (3)	.327	6 (6)	0 (0)	.526
None	9 (12)	5 (13)	.560	14 (14)	0 (0)	.210
Antiviral treatment						
Hydroxychloroquine + azithromycin	61 (84)	23 (61)	.010	80 (80)	4 (36)	.004
Lopinavir + ritonavir	0 (0)	4 (11)	.012	2 (2)	2 (18)	.048
None	17 (23)	6 (16)	.143	18 (18)	5 (45)	.048
TEEs	0 (0)	11 (29)	<.0001			
Venous thrombosis	0 (0)	8 (73)				
Pulmonary embolism	0 (0)	2 (18)				
Ischemic stroke	0 (0)	1 (9)				
Outcomes						
28-day mortality	0 (0)	4 (11)	.012	4 (4)	0 (0)	
Hospitalized in ICU	0 (0)	18 (47)	<.0001	2 (2)	9 (82)	<.0001
Transferred to ICU	NA	6 (30)		13 (14)	1 (9)	.280
Hospital discharged at 28 days	63 (86)	18 (47)	<.0001	76 (100)	5 (45)	.066
White blood cell count						
White blood cell count $\times 10^9$/L	5.62 [4.53-7.41]	6.30 [4.71-9.40]	.232	5.62 [4.43-7.70]	6.7 [5.4-15]	.056
Neutrophils $\times 10^9$/L	3.47 [2.65-5.21]	4.80 [3.17-7.64]	.016	3.55 [2.64-5.70]	5.4 [4.1-11.0]	.019
Lymphocytes $\times 10^9$/L	1.27 [0.95-1.69]	0.82 [0.59-1.20]	.001	1.20 [0.76-1.59]	0.93 [0.82-1.40]	.357
Monocytes $\times 10^9$/L	0.50 [0.37-0.68]	0.46 [0.24-0.62]	.111	0.48 [0.32-0.67]	0.46 [0.27-0.57]	.684
Platelets $\times 10^9$/L	248 [194-318]	272 [187-334]	.947	250 [187-318]	273 [231-364]	.365
Chemistry parameters						
AST, U/L	32 [23-55]	44 [33-61]	.039	35 [24-54]	49 [34-86]	.036
LDH, U/L	287 [224-340]	367 [296-477]	<.0001	296 [230-364]	401 [324-505]	.004
Glomerular filtration rate, mL/min	91 [66-105]	98.5 [45-109]	.542	92 [62-105]	103 [63-112]	.550

Data are n (%) or median (25th to 75th percentile).
aPTT, activated partial thromboplastin time; ICU, intensive care unit; IP-10, interferon γ-induced protein 10; NA, not applicable; TEE, thromboembolic event.

Downloaded from http://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/5/3/628/1798579/advancesadv2020003308.pdf by guest on 30 January 2021

Table 1. (continued)

Characteristic	Moderate COVID-19	Severe COVID-19	*P*	TEE-negative	TEE-positive	*P*
Inflammatory parameters						
CRP, mg/L	38.6 [18.6-80.1]	125.0 [27.3-179.7]	.003	51.1 [18.9-101.9]	95.8 [34.4-227.9]	.257
IP-10, pg/mL	100.5 [23.8-85.3]	201.1 [98.4-336.1]	.004	121.3 [56.4-257.1]	189.8 [111-339.5]	.211
IL-6, pg/mL	24.8 [14.3-46.2]	45.5 [21.0-89.6]	.026	27.9 [16.3-56.5]	73.3 [13.5-137.6]	.094
Haemostasis parameters						
PT, %	91 [80-101]	85 [79-95]	.155	90 [80-100]	83 [69-96]	.405
aPTT ratio	1.10 [0.98-1.19]	1.30 [1.16-1.51]	<.0001	1.14 [1.01-1.30]	1.55 [1.38-2.05]	<.0001
Fibrinogen, g/L	5.90 [5.02-6.88]	6.56 [5.65-7.77]	.037	6.01 [5.15-7.04]	7.31 [5.46-8.00]	.228
D-dimer, ng/mL	0.86 [0.65-1.42]	1.74 [0.97-3.84]	<.0001	0.96 [0.68-1.65]	3.29 [2.17-4.72]	<.0001
Plasminogen, %	108 [89-119]	102 [93-114]	.580	104 [89-116]	110 [101-129]	.193
PAI-1, UA/mL	1.4 [0.0-24.4]	7.6 [0.0-28.6]	.333	9.7 [0.0-27.4]	3.7 [0.0-10.9]	.652
EV subsets, EV/μL						
Platelet	13376 [7995-18887]	8523 [4229-15819]	.011	12441 [7098-18284]	8358 [4182-13688]	.163
Erythrocyte	526 [300-1005]	538 [263-1216]	.727	508 [286-999]	760 [304-4469]	.272
Granulocyte	155 [75-345]	214 [36-696]	.644	155 [74-394]	285 [35-940]	.731
Monocyte	186 [97-340]	201 [110-373]	.929	182 [98-293]	334 [114-634]	.074
Endothelial	143 [88-247]	181 [82-294]	.304	146 [87-245]	272 [181-384]	.043
Functional activities of EVs						
Tissue factor activity (EV-TF), fM	25 [12-59]	231 [39-761]	<.0001	34 [14-105]	629 [79-1104]	<.0001
Fibrinolytic activity (EV-fib), mDO/min	19.2 [9.7-47.8]	28.0 [9.6-92.5]	.301	22.2 [9.5-63.0]	31.1 [10.3-159.2]	.329
Coagulolytic balance (EV-TF/EV-fib)	0.6 [0.3-1.1]	2.0 [0.6-14.6]	<.0001	0.6 [0.3-2.0]	4.2 [1.1-29.5]	.002

Data are n (%) or median (25th to 75th percentile).
aPTT, activated partial thromboplastin time; ICU, intensive care unit; IP-10, interferon γ-induced protein 10; NA, not applicable; TEE, thromboembolic event.

anticoagulation, high levels of D-dimer are associated with a higher incidence of venous and arterial thrombosis in patients with COVID-19 compared with those who do not have COVID-19 but do have a similar degree of illness.[5] Mechanistically, coagulation activation probably occurs because of the combination of hypoxemia, endothelial activation, and a profound inflammatory response in critically ill patients.[6] These pathways converge to the increased expression of endothelial and leukocyte tissue factor (TF), the main initiator of the coagulation cascade. Interestingly, after cellular activation, an active form of TF can be released and is associated with large extracellular vesicles (EVs) that disseminate throughout the entire body and participate in sepsis-induced coagulopathy[7] and thrombus formation.[8] The contribution of EV-TF in the pathophysiology of COVID-19 has been recently suggested by several authors as a potential key link between strong inflammatory cellular activation and dissemination of the prothrombotic state,[6,9] but no data are available thus far. Therefore, we quantified the EV-TF activity in a cohort of hospitalized patients with COVID-19 and evaluated its link with inflammation, disease severity, and thrombotic events. The procoagulant profile of EVs was further compared between patients with severe COVID-19 and patients with septic shock not related to COVID-19.

Methods

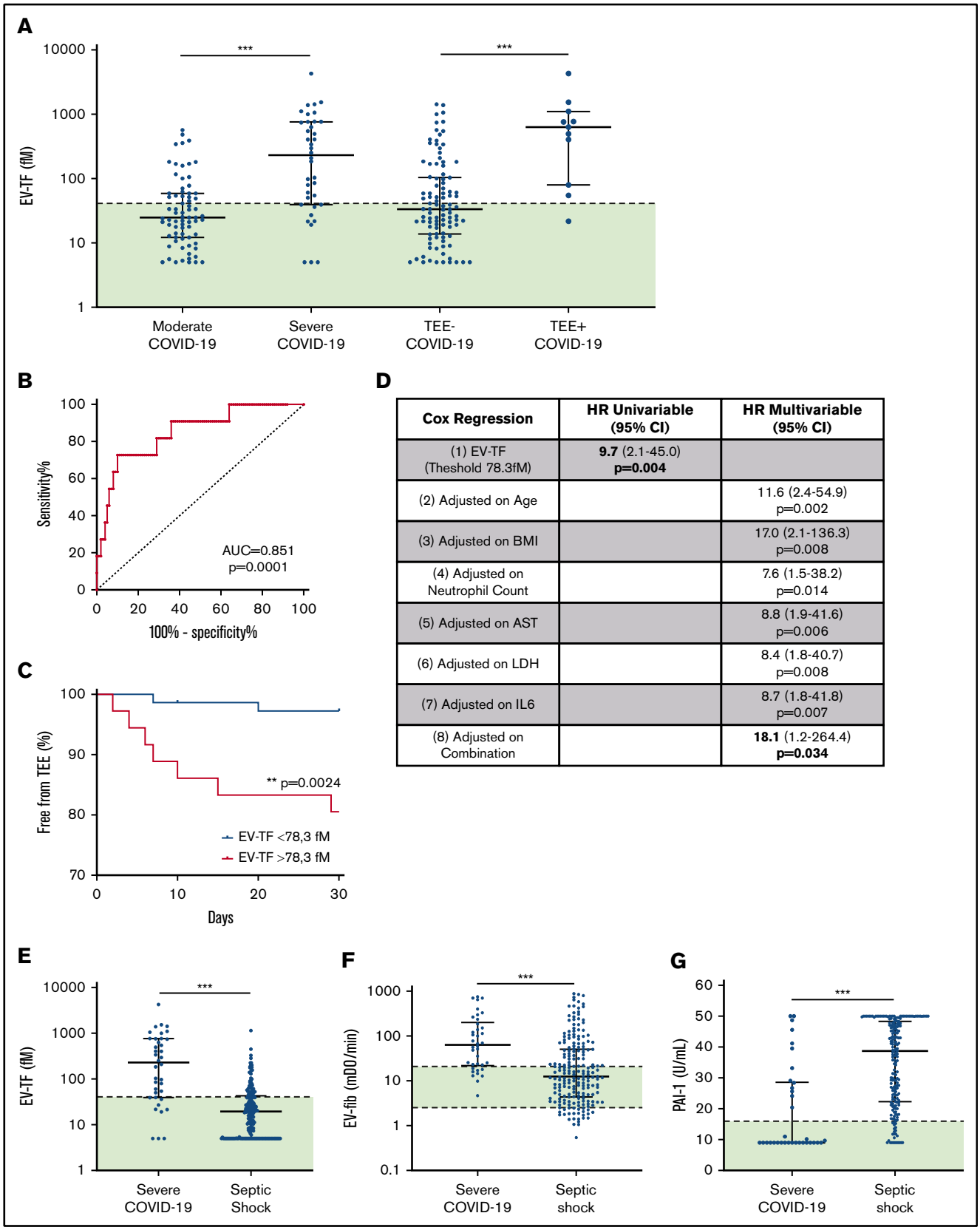
Patients

In all, 111 adult patients with COVID-19 were enrolled in a pilot study approved by the Medical Ethics Committee of Aix-Marseille University between March 20 and April 14, 2020. Written informed consent was obtained from the patients or their relatives. COVID-19 was diagnosed when patients presented with viral pneumonia associated with objective findings on lung computed tomography scan or chest X-ray, and infection was confirmed by positive reverse transcription polymerase chain reaction. Patients with severe disease were defined as those hospitalized in the intensive care unit or requiring more than 6 L per minute of oxygen to achieve peripheral oxygen saturation (SpO_2) ≥95%. Patients with moderate disease were defined as hospitalized patients who did not meet the criteria used to define patients with severe disease. Among the patients with moderate disease, some required oxygen supplementation or were observed for diabetes, chronic renal disease, or biological severity (evidenced by D-dimer >1 mg/mL, C-reactive protein [CRP] >50 mg/L) (Table 1). Blood samples were collected within 48 hours of patient admission. The patient characteristics, including demographics, comorbidities, treatments, and main outcomes, were recorded. An angiography computed tomography scan was systematically performed only in patients supported by venous extracorporeal membrane oxygenationafter a canula was removed. In other cases, thromboembolic disease was diagnosed by venous Doppler in case of clinical symptoms or an increase in D-dimer levels. The data for patients with severe COVID-19 were retrospectively compared with those for patients with septic shock not related to COVID-19 (n = 218) from a local cohort (NCT02062970). Clinical and biological data for these patients are provided in supplemental Table 1.

Laboratory parameters

Routine blood chemistry and hematologic parameters, including the blood count, aminotransferases, lactate dehydrogenase (LDH),

Downloaded from http://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/5/3/628/1798579/advancesadv2020003308.pdf by guest on 30 January 2021



Cox Regression	HR Univariable (95% CI)	HR Multivariable (95% CI)
(1) EV-TF (Theshold 78.3fM)	**9.7** (2.1-45.0) **p=0.004**	
(2) Adjusted on Age		11.6 (2.4-54.9) p=0.002
(3) Adjusted on BMI		17.0 (2.1-136.3) p=0.008
(4) Adjusted on Neutrophil Count		7.6 (1.5-38.2) p=0.014
(5) Adjusted on AST		8.8 (1.9-41.6) p=0.006
(6) Adjusted on LDH		8.4 (1.8-40.7) p=0.008
(7) Adjusted on IL6		8.7 (1.8-41.8) p=0.007
(8) Adjusted on Combination		**18.1** (1.2-264.4) **p=0.034**

Figure 1. EV-TF activity with COVID-19 severity and TEEs. (A) Plasma levels of EV-TF activity in patients with moderate (n = 73) or severe (n = 38) COVID-19 and in the presence (TEE-positive, n = 11) or absence (TEE-negative, n = 100) of TEEs. (B) Receiver operating characteristic curve for TEE prediction using EV-TF (red) area under the curve (AUC), 0.851. The Youden index was determined for EV-TF of 78.3 fM with a sensitivity of 0.818 and a specificity of 0.710. (C) Timing of TEE with an EV-TF threshold of

Downloaded from http://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/5/3/628/1798579/advancesadv2020003308.pdf by guest on 30 January 2021

glomerular filtration rate, and CRP were recorded. Hemostasis exploration was performed by measuring the PT, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, D-dimer (STA-Liatest D-Di Plus), plasminogen, and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) activity (STA R Max, Diagnostica Stago, Asnières, France). The serum levels of interferon-γ–inducible protein 10 (IP-10) and interleukin-6 (IL-6) were quantified using the magnetic luminex assay (Bio-Techne, Minneapolis, MN).

EV assays

Citrate plasma samples were prepared according to the current international guidelines for EVs.[10,11] Circulating EVs were enumerated by flow cytometry according to their cell of origin, as detailed in the supplemental Materials and methods. The profibrinolytic (EV-fib) and TF-dependent procoagulant (EV-TF) activities of EVs were measured by using sensitive assays as recently described.[12,13]

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 15.0 software. Categorical variables were presented as frequencies, and continuous variables were presented as the median and 25th to 75th percentiles. Comparisons between groups were performed using nonparametric tests (Mann-Whitney *U* test and Kruskal-Wallis test) for quantitative variables and Fisher's exact tests for frequencies. Associations between continuous variables were analyzed using Spearman's correlation tests. Multivariable analyses using Cox regression were performed to determine the impact of cardiovascular risk factors and comorbidities on EV-TF levels. All tests were 2-sided. Statistical significance was defined as $P < .05$.

Results and discussion

The patients' characteristics were compared between patients with either severe or moderate forms of COVID-19 (Table 1). Patients with severe COVID-19 were younger and had lower oxygen saturation at admission than patients with moderate COVID-19. Despite venous thromboembolic prophylaxis with heparin, 29% of patients with severe forms of COVID-19 had thromboembolic events, including 8 deep venous thromboses, 2 pulmonary embolisms, and 1 ischemic stroke. Among patients with severe forms of COVID-19, 4 (11%) died within 28 days. At inclusion, the patients with severe forms of COVID-19 had profound lymphopenia and higher neutrophils, aminotransferases, and LDH than those with moderate forms. They also displayed higher inflammatory markers and a marked increase in D-dimer.

Circulating EV subsets were quantified by sensitive flow cytometry (Table 1). No striking differences between EV subsets were found between the moderate and severe forms of COVID-19. By contrast, the EV-TF activity was dramatically increased in patients with severe disease compared with that in patients with moderate disease (median, 231 [25th to 75th percentile, 39-761] vs median, 25 [25th to 75th percentile, 12-59] fM, respectively; $P < .0001$) (Figure 1A). This EV-TF activity was positively correlated with leukocytes ($r = 0.41$; $P < .0001$), neutrophils ($r = 0.46$; $P < .0001$), monocytes ($r = 0.34$; $P < .0001$), and inflammation parameters, including fibrinogen ($r = 0.46$; $P < .0001$), CRP ($r = 0.40$; $P < .0001$), and IL-6 ($r = 0.29$; $P = .002$), suggesting an immuno-inflammatory origin of the circulating EV-TF activity in patients with COVID-19.

EV-TF activity was correlated positively with D-dimer ($r = 0.55$; $P < .0001$) and negatively with PT ($r = –0.27$; $P = .005$), showing a link with markers of COVID-19–induced coagulopathy. Moreover, EV-TF activity was significantly increased in patients with symptomatic clinical thromboembolic events within 28 days after sampling (median, 629 [25th to 75th percentile, 79-1104] vs median, 34 [25th to 75th percentile, 14-105] fM; $P < .0001$; Figure 1A). A cutoff value of 78 fM, about twice the upper limit of the value found in healthy donors,[13] was determined on the receiver operating characteristic curve (area under the curve, 0.851; $P < .0001$; Figure 1B). This cutoff stratifies the hospitalized patients with COVID-19 into 2 groups with a significant difference in thrombotic risk (6.5% vs 1.9%; $P = .002$; Figure 1C). This increased risk of thrombosis in patients with EV-TF levels >78 fM was confirmed after the adjustment for age, body mass index, neutrophil count, aspartate aminotransferase, LDH, and IL-6 in multivariable Cox regression models (Figure 1D).

To better understand the degree of EV-associated hemostatic imbalance in patients with severe COVD-19, we compared the data with a parallel cohort of patients with septic shock not related to COVID-19, as a clinical situation associated with sepsis-induced coagulopathy (supplemental Table 1). Sex ratio and comorbidities were comparable between the 2 groups. Patients with severe COVID-19 were younger than those with septic shock. The samples were measured in the same laboratory with the same preanalytical conditions and methodology as that used for samples from patients with COVID-19. Interestingly, we observed striking differences between patients with COVID-19 and those with septic shock; there were significantly higher EV-TF (Figure 1E) and fibrinolytic activities (Figure 1F) in COVID-19 that were not associated with PAI-1 increase (Figure 1G).

These data demonstrate a distinct profile of COVID-associated coagulopathy with a strong procoagulant imbalance characterized by an extremely high level of EV-TF without peripheral fibrinolytic shutdown, which likely explains the high level of reported D-dimer.[14] From a therapeutic perspective, these data support the international recommendation of systematic preventive anticoagulation in hospitalized patients[15] and a potential intensification in patients with severe disease. As previously discussed,[16-19] the benefit of a profibrinolytic therapeutic approach remains questionable because of the maintenance of fibrinolytic activity in patients and increased bleeding risk[20] in COVID-19. However, the fibrinolytic system seems finally overwhelmed, suggesting that a PAI-1

Figure 1. (continued) 78.3fM, which is higher than 78.3 fM in red and lower than 78.3 fM in blue. (D) Logistic models (Cox regression): (1) unadjusted (EV-TF level only); (2-7) EV-TF adjusted for age, body mass index (BMI), neutrophil level, aspartate aminotranferase (AST) level, LDH level, and IL-6 level; and (8) adjusted with the combination of all parameters. (E-G) Plasma levels of EV-TF, EV-fib (fibrinolytic activity of EVs), and PAI-1 activity in patients with severe COVID-19 compared with patients with septic shock. The horizontal line and the error bars represent median and interquatile range, respectively. The green areas represent the range of values found in healthy donors. ** $P < .01$; *** $P < .001$. CI, confidence interval; HR, hazard ratio; mDO, milliOpticalDensity; TEE, thromboembolic event.

Downloaded from http://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/5/3/628/1798579/advancesadv2020003308.pdf by guest on 30 January 2021

increase can occur in patients with severe COVID-19 in the final stages of the disease.[21]

In summary, this study is the first to report the dissemination of extreme levels of EV-TF in severe COVID-19. The intercellular transfer of TF via EVs or the direct contribution of EV-TF to thrombus growth may contribute to the link between inflammation and thrombosis. EV-TF may be an appropriate tool for stratifying patients with the highest risk of thrombosis and for personalization of anticoagulant therapy.

Acknowledgments

The authors thank Patricia Berenger, Cécile Daou, Clara Degioanni, and Léa Plantureux for their technical help during this study, and they are grateful to the many front-line medical and technical staff for their dedication in the face of this outbreak, despite the potential threat to their lives and the lives of their families.

This study was supported by Aix-Marseille University, INSERM, and Assistance Publique–Hôpitaux de Marseille.

Authorship

Contribution: C.G. initiated and performed the research, analyzed and interpreted the data, and helped write the manuscript; A.B., S.B., and G.K. performed the study and analyzed and interpreted the data; F.S., R.C., E.A., L.A., G.L., L. Pietri, T.R., M.V., L. Papazian, and J.A. performed the research; F.D.-G. and R.L. supervised the work and wrote the manuscript; and all authors critically revised the manuscript for important intellectual content and gave final approval for the version to be published.

Conflict-of-interest disclosure: F.D.-G. and R.L. received grants from Stago and a patent on microvesicle fibrinolytic activity licensed to Stago. C.G. received personal fees from Xenios (a Fresenius Medical Care company). S.B. received personal fees from Otsuka, Bayer, and Sanofi. These disclosures are outside the submitted work. The remaining authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: R.C., 0000-0001-9316-5231; G.L., 0000-0003-1692-5799; T.R., 0000-0002-7580-0913; M.V., 0000-0002-1121-8270; R.L., 0000-0002-5756-470X.

Correspondence: Françoise Dignat-George, Unité de Formation et de Recherche Pharmacie-Aix Marseille Université, 27 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France; e-mail: francoise.dignat-george@univ-amu.fr.

References

1. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506.
2. Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*. 2020;135(23):2033-2040.
3. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):844-847.
4. Iba T, Levy JH, Connors JM, Warkentin TE, Thachil J, Levi M. The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy. *Crit Care*. 2020;24(1):360.
5. Poissy J, Goutay J, Caplan M, et al; Lille ICU Haemostasis COVID-19 Group. Pulmonary embolism in patients with COVID-19: Awareness of an increased prevalence. *Circulation*. 2020;142(2):184-186.
6. McFadyen JD, Stevens H, Peter K. The emerging threat of (micro)thrombosis in COVID-19 and its therapeutic implications. *Circ Res*. 2020;127(4):571-587.
7. Iba T, Ogura H. Role of extracellular vesicles in the development of sepsis-induced coagulopathy. *J Intensive Care*. 2018;6(1):68.
8. Grover SP, Mackman N. Tissue factor: An essential mediator of hemostasis and trigger of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(4):709-725.
9. Marchandot B, Sattler L, Jesel L, et al. COVID-19 related coagulopathy: A distinct entity? *J Clin Med*. 2020;9(6):1651.
10. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ Res*. 2017;120(10):1632-1648.
11. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750.
12. Cointe S, Harti Souab K, Bouriche T, et al. A new assay to evaluate microvesicle plasmin generation capacity: validation in disease with fibrinolysis imbalance. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1494482.
13. Vallier L, Bouriche T, Bonifay A, et al. Increasing the sensitivity of the human microvesicle tissue factor activity assay. *Thromb Res*. 2019;182:64-74.
14. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054-1062.
15. Spyropoulos AC, Levy JH, Ageno W, et al; Subcommittee on Perioperative, Critical Care Thrombosis, Haemostasis of the Scientific, Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Scientific and Standardization Committee communication: Clinical guidance on the diagnosis, prevention, and treatment of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2020;18(8):1859-1865.
16. Medcalf RL, Keragala CB, Myles PS. Fibrinolysis and COVID-19: A plasmin paradox. *J Thromb Haemost*. 2020;18(9):2118-2122.
17. Barrett CD, Moore HB, Moore EE, et al. Fibrinolytic therapy for refractory COVID-19 acute respiratory distress syndrome: Scientific rationale and review. *Res Pract Thromb Haemost*. 2020;4(4):524-531.

Downloaded from http://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/5/3/628/1798579/advancesadv2020003308.pdf by guest on 30 January 2021

18. Wright FL, Vogler TO, Moore EE, et al. Fibrinolysis shutdown correlation with thromboembolic events in severe COVID-19 infection. *J Am Coll Surg*. 2020;231(2):193-203.e1.

19. Whyte CS, Morrow GB, Mitchell JL, Chowdary P, Mutch NJ. Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of thrombolytic drugs to treat COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2020;18(7):1548-1555.

20. Al-Samkari H, Karp Leaf RS, Dzik WH, et al. COVID-19 and coagulation: bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Blood*. 2020; 136(4):489-500.

21. Tang N, Bai H, Xiong D, Sun Z. Specific coagulation markers may provide more therapeutic targets in COVID-19 patients receiving prophylactic anticoagulant. *J Thromb Haemost*. 2020;18(9):2428-2430.

Downloaded from http://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/5/3/628/1798579/advancesadv2020003308.pdf by guest on 30 January 2021

Annexe 10 : Kyriazopoulou *et al*, Lancet Rheumatol, 2021

Effect of anakinra on mortality in patients with COVID-19: a systematic review and patient-level meta-analysis

*Evdoxia Kyriazopoulou, Thomas Huet, Giulio Cavalli, Andrea Gori, Miltiades Kyprianou, Peter Pickkers, Jesper Eugen-Olsen, Mario Clerici, Francisco Veas, Gilles Chatellier, Gilles Kaplanski, Mihai G Netea, Emanuele Pontali, Marco Gattorno, Raphael Cauchois, Emma Kooistra, Matthijs Kox, Alessandra Bandera, Hélène Beaussier, Davide Mangioni, Lorenzo Dagna, Jos W M van der Meer, Evangelos J Giamarellos-Bourboulis, Gilles Hayem, for the International Collaborative Group for Anakinra in COVID-19**

Summary

Background **Anakinra might improve the prognosis of patients with moderate to severe COVID-19 (ie, patients requiring oxygen supplementation but not yet receiving organ support). We aimed to assess the effect of anakinra treatment on mortality in patients admitted to hospital with COVID-19.**

Methods **For this systematic review and individual patient-level meta-analysis, a systematic literature search was done on Dec 28, 2020, in Medline (PubMed), Cochrane, medRxiv, bioRxiv, and the ClinicalTrials.gov databases for randomised trials, comparative studies, and observational studies of patients admitted to hospital with COVID-19, comparing administration of anakinra with standard of care, or placebo, or both. The search was repeated on Jan 22, 2021. Individual patient-level data were requested from investigators and corresponding authors of eligible studies; if individual patient-level data were not available, published data were extracted from the original reports. The primary endpoint was mortality after 28 days and the secondary endpoint was safety (eg, the risk of secondary infections). This study is registered on PROSPERO (CRD42020221491).**

Findings **209 articles were identified, of which 178 full-text articles fulfilled screening criteria and were assessed. Aggregate data on 1185 patients from nine studies were analysed, and individual patient-level data on 895 patients were provided from six of these studies. Eight studies were observational and one was a randomised controlled trial. Most studies used historical controls. In the individual patient-level meta-analysis, after adjusting for age, comorbidities, baseline ratio of the arterial partial oxygen pressure divided by the fraction of inspired oxygen (PaO_2/FiO_2), C-reactive protein (CRP) concentrations, and lymphopenia, mortality was significantly lower in patients treated with anakinra (38 [11%] of 342) than in those receiving standard of care with or without placebo (137 [25%] of 553; adjusted odds ratio [OR] 0·32 [95% CI 0·20–0·51]). The mortality benefit was similar across subgroups regardless of comorbidities (ie, diabetes), ferritin concentrations, or the baseline PaO_2/FiO_2. In a subgroup analysis, anakinra was more effective in lowering mortality in patients with CRP concentrations higher than 100 mg/L (OR 0·28 [95% CI 0·17–0·47]). Anakinra showed a significant survival benefit when given without dexamethasone (OR 0·23 [95% CI 0·12–0·43]), but not with dexamethasone co-administration (0·72 [95% CI 0·37–1·41]). Anakinra was not associated with a significantly increased risk of secondary infections when compared with standard of care (OR 1·35 [95% CI 0·59–3·10]).**

Interpretation **Anakinra could be a safe, anti-inflammatory treatment option to reduce the mortality risk in patients admitted to hospital with moderate to severe COVID-19 pneumonia, especially in the presence of signs of hyperinflammation such as CRP concentrations higher than 100 mg/L.**

Funding **Sobi.**

Copyright **© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.**

Introduction

The COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, has affected more than 200 countries, with millions of confirmed cases and deaths worldwide.[1] The most severe and lethal forms of COVID-19 have been linked to different and possibly combined pathophysiological processes, including severe acute diffuse alveolar damage and hyaline deposits in the lungs induced by SARS-CoV-2, multiple arterial and venous thromboses resulting from both endotheliitis and hypercoagulability, and a hyperinflammatory response caused by over-production of pro-inflammatory cytokines. Although systemically a cytokine storm might not always occur in patients,[2–4] there are clear indications of pulmonary compartmentalisation of hyperinflammation.[5–8]

To control the hyperinflammatory syndrome induced by SARS-CoV-2, in which the interleukin (IL)-1–IL-6 pathway is involved, various targeted therapies have been tested, predominantly in combination with antibiotics and anticoagulants. Anakinra, a recombinant IL-1 receptor antagonist, was selected as a logical candidate in the early days of the pandemic, since it had

Lancet Rheumatol 2021

Published Online
August 9, 2021
https://doi.org/10.1016/S2665-9913(21)00216-2

See Online/Comment
https://doi.org/10.1016/S2665-9913(21)00249-6

*Members of the International Collaborative Group for Anakinra in COVID-19 are listed at the end of the appendix

4th Department of Internal Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Medical School, Athens, Greece (E Kyriazopoulou MD, M Kyprianou BSc, Prof E J Giamarellos-Bourboulis MD); **Rheumatology Department, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Paris, France** (T Huet MD, G Chatellier MD, H Beaussier PhD, Prof G Hayem MD); **Unit of Immunology, Rheumatology, Allergy, and Rare Diseases, IRCCS San Raffaele Scientific Institute; Vita-Salute San Raffaele University, Milan, Italy** (Prof G Cavalli MD, Prof L Dagna MD); **Infectious Disease Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy** (Prof A Gori MD, Prof A Bandera MD, D Mangioni MD); **Department of Pathophysiology and Transplantation** (Prof A Gori, Prof M Clerici MD, Prof A Bandera, D Mangioni), **and Centre for Multidisciplinary Research in Health Science** (Prof A Gori, Prof A Bandera, D Mangioni), **University of Milan, Milan, Italy; Department of Intensive Care Medicine** (Prof P Pickkers MD, E Kooistra MD, Prof M Kox MD), **and Department of Internal Medicine and Center for Infectious Diseases** (Prof M G Netea MD, Prof J W M van der Meer MD),

Radboud University, Nijmegen, Netherlands; Department of Clinical Research, Copenhagen University Hospital, Hvidovre, Denmark (J Eugen-Olsen PhD); **Don C Gnocchi Foundation, IRCCS, Milan, Italy** (Prof M Clerici); **Montpellier University, French Research Institute for Development, UMR5151, Mitigation Strategies for Biosecurity Risks/MSBR, PHYSE, Faculty of Pharmacy, Montpellier, France** (Prof F Veas PhD); **Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, Division of Internal Medicine and Clinical Immunology, Hôpital Conception, Aix-Marseille Université, Marseille, France** (Prof G Kaplanski MD, R Cauchois MD); **Ente Ospedaliero Galliera, Genova, Italy** (E Pontali MD); **Center for Autoinflammatory diseases and Immunodeficiencies, IRCCS G Gaslini, Genova, Italy** (M Gattorno MD)

Correspondence to: Prof Evangelos J Giamarellos-Bourboulis, 4th Department of Internal Medicine, ATTIKON University Hospital, 124 62 Athens, Greece
egiamarel@med.uoa.gr

See Online for appendix

Research in context

Evidence before this study

Since the emergence of the COVID-19 pandemic, numerous drugs have been administered to patients with the aim of preventing major detrimental consequences, such as respiratory and multiorgan failure and death. During the early stages of the pandemic, physicians realised that drugs aiming to regulate the host immune response might play an important role in the treatment of COVID-19. Evidence from a small number of patients with moderate or severe COVID-19 treated with anakinra, an interleukin-1 receptor antagonist, has suggested therapeutic efficacy of the drug. We systematically searched the available literature for published studies of anakinra treatment in patients admitted to hospital with COVID-19, to investigate its effect on mortality. Medline (PubMed), Cochrane, medRxiv, bioRxiv, and ClinicalTrials.gov databases were searched on Dec 28, 2020, using the terms "COVID-19" or "SARS-CoV-2" and "anakinra", "interleukin-1", and "interleukin blockade".

Added value of this study

This study is, to our knowledge, the first patient-level meta-analysis to analyse the effects of anakinra treatment in patients admitted to hospital with moderate to severe COVID-19, showing a significant reduction in mortality with anakinra and also demonstrating the safety of the treatment. Most importantly, this study identifies a subgroup of patients who might benefit most from treatment with anakinra: those with C-reactive protein concentrations higher than 100 mg/L. Large, randomised controlled trials are urgently needed to further investigate the effectiveness of anakinra in this setting.

Implications of all the available evidence

Anakinra could be an effective and safe immunomodulatory treatment to prevent unfavourable outcomes in moderate-to-severe cases of pneumonia due to COVID-19. Additionally, anakinra might be helpful in avoiding adverse events, such as the secondary infections observed frequently with dexamethasone use, and could be considered as an alternative treatment option in specific subgroups (eg, patients with diabetes). Larger trials are ongoing, and their results are urgently needed to further investigate the most effective use of anakinra in the treatment of COVID-19 (ie, to establish in which patient population it is most suitable, which is the ideal biomarker to define patient status, which dose should be administered, and which is the most appropriate timepoint to administer the drug during the course of the disease).

previously been tested—with encouraging results—in other hyperinflammatory situations, including the macrophage activation syndrome complicating severe bacterial sepsis and the cytokine release syndrome observed during antitumoral chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy.[9–11]

Case series of a small number of patients with moderate or severe COVID-19 treated with anakinra have been published during the early period of the pandemic, suggesting promising results and paving the way for additional larger studies.[12–15] In most studies, anakinra was administered on an off-label basis in patients with clinical or laboratory signs of hyperinflammation, or both, or in the context of clinical trials, in an attempt to dampen the IL-1-driven inflammation that is believed to play an important role in COVID-19 pathophysiology. We aimed to investigate the effect of anakinra treatment on mortality in patients admitted to hospital with COVID-19, and to better characterise subgroups of patients most likely to benefit from such a tailored immunotherapy.

Methods

Search strategy and selection criteria

This systematic review and patient-level meta-analysis was done according to the Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement,[16] based on a pre-specified protocol (PROSPERO: CRD42020221491). Eligibility criteria were defined with the PICO statement as follows: P=patients admitted to hospital with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection; I=treatment with anakinra; C=patients receiving standard of care or placebo comparator on top of standard of care; O=mortality rate, and rate of common adverse events such as elevated liver function tests, leukopenia, and secondary infections. All randomised trials, comparative studies, and observational studies, published as full text in English were included, whereas editorials, conference abstracts, studies done in animals, case reports, and articles not written in the English language or not providing the full text were excluded. Systematic reviews were consulted for additional information, but were excluded to avoid duplication.

The search was done on Dec 28, 2020, and repeated on Jan 22, 2021, by two independent authors (EKy and EJG-B), across Medline (PubMed), Cochrane, medRxiv, bioRxiv, and ClinicalTrials.gov databases using the following terms: "COVID-19" or "SARS-CoV-2" and "anakinra", "interleukin-1", and "interleukin blockade". Details of the search strategy are provided in the appendix (pp 1–2). Both reviewers assessed all articles first on the basis of the title, then on the basis of the abstract, and finally the full text to identify eligible studies. Any between-reviewer disagreements were resolved by discussion between them. Individual patient-level data were requested from investigators and corresponding authors of all eligible articles. Data from each study were first checked against reported results and queries were resolved with the investigators. Data were assessed in a consistent manner across all studies with standard definitions and variables. Data on the following variables

were collected: first author name, country of origin, publication date, study design, total number of patients, criteria for enrolment, number of patients treated with anakinra, number of controls, age and comorbidities of participants, serum ferritin and C-reactive protein (CRP) concentrations at baseline, respiratory ratio at baseline, route of anakinra administration, intake of steroids, mortality, onset of respiratory failure necessitating invasive mechanical ventilation, and onset of adverse events (elevated liver function tests, leukopenia, and secondary infections). If individual patient-level data were not available, all above available data were extracted independently by EKy and EJG-B.

The quality of each study was evaluated by EKy and EJG-B with the Newcastle-Ottawa scale.[17] Across the entire process, between-reviewer disagreements were resolved by discussion between them.

Data analysis

The primary endpoint was mortality after 28 days. For studies with a shorter follow-up, data were censored at the last observation. The secondary endpoint was safety, assessed by the rate of adverse events. Odds ratios and their respective 95% CIs were used to compare anakinra-treated patients to control groups for each endpoint. Pre-defined subgroup analyses were done for the primary endpoint according to the following variables: the baseline ratio of the arterial partial oxygen pressure divided by the fraction of inspired oxygen (PaO_2/FiO_2), baseline CRP and serum ferritin concentrations, and the Charlson Comorbidity Index. A logistic regression analysis was done: first, to detect any interaction effect of anakinra treatment with the different studies; and second, to detect whether the effect of anakinra on the primary outcome remained independent of factors interfering with mortality (ie, age, Charlson comorbidity index, CRP, and PaO_2/FiO_2). Predefined cutoffs were used for characterisation of the above subgroups.[18–21] Sensitivity analyses were planned for time period (ie, before and after implementation of dexamethasone) and for randomised controlled trials. Meta-analysis of aggregate data was done by the Mantel-Haenszel method. The Sidik-Jonkman estimator was used for τ^2 and the Q-profile method used for the confidence interval of τ^2 and τ. A continuity correction of 0·1 was applied in studies with zero cell frequencies. Finally, heterogeneity and inconsistency were assessed in a meta-analysis of aggregate data from all eligible studies using the I^2 criterion. The fixed-effects model was used for I^2 less than 50%, and the random-effects model used for I^2 50% or greater. The corresponding forest plot was produced, and publication bias was assessed with the funnel plot. Studies without available individual patient-level data were only included in the aggregate data meta-analysis. No imputation was made for missing data within individual patient-level data. All statistical analyses were done with SPSS (version 23) and Review Manager (version 5.3).

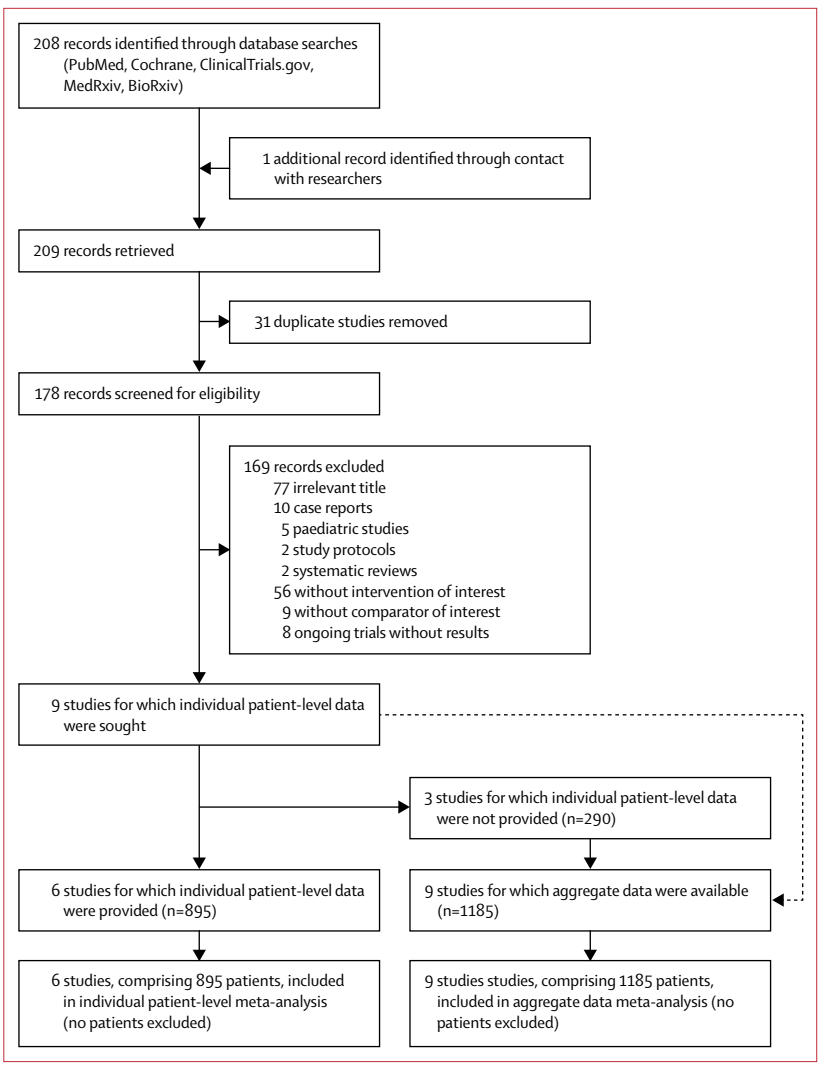


Figure 1: **Study selection**

Role of the funding source

Sobi supported this study by providing a small research grant to cover the cost of the statistical analysis. The funder had no role in study design or conduct, data analysis, data interpretation, or in preparation of the manuscript.

Results

209 articles were identified: 208 from the initial search and one from contact with researchers. After removal of duplicates, 178 full-text articles were screened. After excluding 169 records, there were nine eligible studies for which individual patient-level data were sought.[22–30] Aggregate data from these nine studies, comprising 1185 patients, were analysed, and individual patient-level data were provided for six of these studies, comprising 895 patients (figure 1). Eight studies were observational (either prospective or retrospective) and only one was a

	Study type; individual patient data available?	Study setting and period	Inflammation criteria for inclusion	Number of patients		Route of administration	Steroid intake
				Anakinra group	Control group		
Cauchois et al (2020)[22]	Observational; yes	France: not mentioned	CRP >110 mg/L	12	10	Intravenous	No dexamethasone as standard of care; no other steroids
Huet et al (2020)[23]	Observational; yes	France: March, 2020 (historical controls); March 24–April 6, 2020 (anakinra group)	..	52	44	Subcutaneous	No dexamethasone as standard of care; steroid pulse in 2 of 52 patients in anakinra group
The CORIMUNO-19 Collaborative group (2021)[24]	Randomised controlled trial; no	France: April 8–26, 2020	CRP >25 mg/L	59	55	Intravenous	Dexamethasone in 1 of 59 in anakinra group; other glucocorticoids in 6 of 59 in anakinra group, and 8 of 55 in control group
Bozzi et al (2021)[25]	Observational; yes	Italy: Feb 25–March 30, 2020	CRP > 100 mg/L or ferritin >1000 µg/L, or both	65	55	Subcutaneous; intravenous if on invasive mechanical ventilation	No dexamethasone as standard of care; methylprednisolone co-administered with anakinra
Cavalli et al (2021)[26]	Observational; yes	Italy: March 10–17, 2020 (historical controls); March–May, 2020 (anakinra group)	CRP >100 mg/L or ferritin >900 µg/L	62	275	Intravenous	Dexamethasone in 54 of 275 controls and in 7 of 62 in anakinra group
Pontali et al (2021)[27]	Observational; no	Italy: Feb 26–April 29, 2020	CRP or ferritin >3 times the normal limits	63	44	Intravenous	No dexamethasone as standard of care; methylprednisolone in 33 of 63 patients in anakinra group
Kooistra et al (2020)[28]	Observational; yes	Netherlands: March 11–April 27, 2020	Ferritin >1800 µg/L; clinical hyperinflammation signs (persistent fever, unexplained progression of multiorgan failure)	21	39	Intravenous	Dexamethasone in 14 of 39 patients on standard of care and in 3 of 21 in anakinra group
Kyriazopoulou et al (2021)[29]	Observational; yes	Greece: April 16–Sept 12, 2020	suPAR >6 µg/L	130	130	Subcutaneous	Dexamethasone as standard of care in 47 of 130 controls and in 52 of 130 in anakinra group
Balkhair et al (2021)[30]	Observational; no	Oman: April 1–June 14, 2020 (historical controls); June 15–July 25, 2020 (anakinra group)	..	45	24	Subcutaneous	Dexamethasone in 24 of 45 in anakinra group, and 3 of 24 controls; methylprednisolone in 1 of 45 in anakinra group, and in 13 of 24 controls

CRP=C-reactive protein. suPAR=soluble urokinase-type plasminogen activator receptor.

Table 1: **Characteristics of included studies**

randomised controlled trial.[24] 103 (12%) of 895 patients were on mechanical ventilation at baseline. Among the three studies for which individual patient-level data were not obtained,[24,27,30] two favoured anakinra treatment[27,30] and one did not.[24] Characteristics of the included studies are summarised in table 1. Three studies were done in France,[22–24] three in Italy,[25–27] one in the Netherlands,[28] one in Greece,[29] and one in Oman.[30] Data published during the early period of the pandemic in an Italian study[31] were integrally included in a larger study of the same group;[26] thus, to avoid duplication, the first cohort was not included. Seven studies were done before implementation of dexamethasone in standard-of-care treatment of patients with COVID-19; one study recruited anakinra-treated patients after dexamethasone implementation, whereas patients in the control group were recruited before its implementation and all patients in the control group received methylprednisolone;[30] and only one study prospectively recruited both anakinra-treated and control patients after implementation of dexamethasone into standard of care.[29] In another study, methylprednisolone was part of the intervention as it was co-administered with anakinra.[25] Mortality data after 28 days were available from seven studies, whereas data were censored at the last observation in two studies[23,30] with a shorter follow-up. An assessment of the individual risk of bias according to the Newcastle-Ottawa scale is provided in the appendix (p 5). The overall quality of included studies was high.

Aggregate data from nine studies, comprising 1185 patients (509 on anakinra and 676 controls), showed a significant reduction in mortality among anakinra-treated patients compared with patients receiving standard of care with or without placebo; the pooled odds ratio (OR) for mortality was 0·37 (95% CI 0·27–0·51; I^2 31%), as shown in figure 2. There was no evidence of publication bias (test for funnel plot asymmetry: t=–0·9137, p=0·39; appendix p 6). In the individual patient-level meta-analysis, comprising 895 patients, 38 (11%) of 342 anakinra-treated

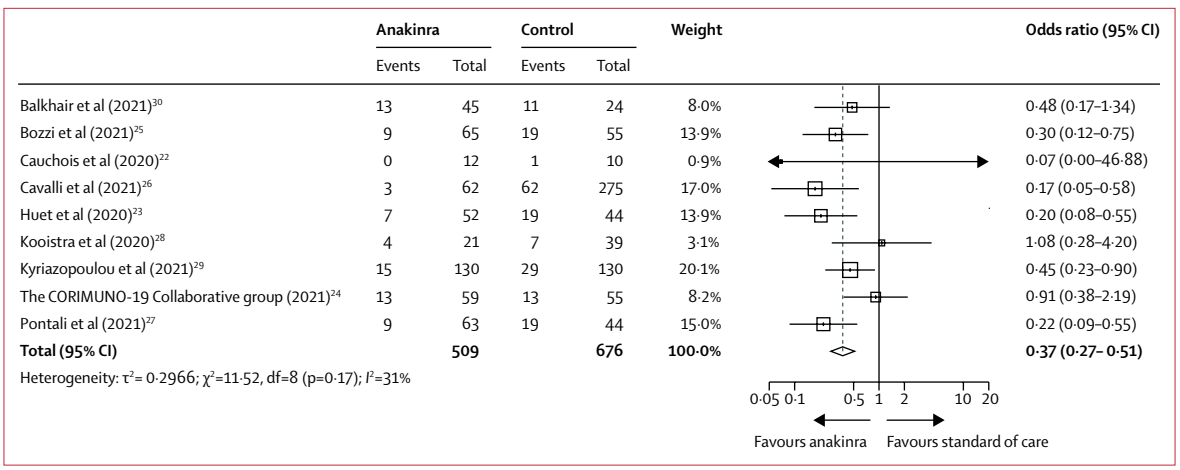


Figure 2: **Forest plot showing mortality from aggregate data meta-analysis**
Odds ratios calculated with a fixed-effects Mantel-Haenszel test.

patients died versus 137 (25%) of 553 patients receiving standard of care with or without placebo (OR 0·38 [95% CI 0·26–0·56]; p<0·0001; table 2). No interaction effect was observed among the six studies and anakinra treatment for the primary outcome (p=0·15; table 2). After adjusting for age, comorbidities, baseline PaO_2/FiO_2, lymphopenia and CRP concentrations, anakinra was shown to independently protect against mortality (adjusted OR 0·32 [95% CI 0·20–0·51]; p<0·0001; table 2). Similar ORs were estimated for anakinra treatment after adjustment for ferritin (data available for 486 patients; adjusted OR 0·35 [95% CI 0·23–0·52]; p<0·0001) and IL-6 concentrations (data available for 530 patients; 0·54 [0·33–0·87]; p=0·01). The predefined sensitivity analyses for randomised controlled trials were not possible, since only one randomised controlled trial was included in this meta-analysis.

The mortality reduction associated with anakinra treatment was significant in the absence of dexamethasone co-administration (559 patients; OR 0·23 [95% CI 0·12–0·43]), but not with co-administration of dexamethasone (239 patients; 0·72 [0·37–1·41]; $p_{Breslow}$=0·012). Similarly, this beneficial effect of anakinra was significant in patients breathing spontaneously at baseline (792 patients; OR 0·30 [95% CI 0·19–0·48]) but not in the smaller subgroup of those who were mechanically ventilated at baseline (103 patients; 0·52 [0·20–1·36]; $p_{Breslow}$=0·45). Subgroup analyses adjusting for CRP and ferritin concentrations and baseline PaO_2/FiO_2 showed that anakinra was more effective in lowering mortality in patients presenting with CRP concentrations higher than 100 mg/L (OR 0·28 [95% CI 0·17–0·47]), but the therapeutic efficacy of anakinra did not appear to be related to baseline ferritin concentrations or baseline PaO_2/FiO_2 (figure 3). In a subgroup analysis of 116 patients with diabetes and 299 patients without diabetes, the effect of anakinra on mortality was similar in both groups (OR 0·40 [95% CI 0·17–0·91] *vs* 0·37 [0·19–0·74]; $p_{Breslow}$=0·90).

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Odds ratio (95% CI)	p value	Odds ratio (95% CI)	p value
Anakinra treatment	0·38 (0·26–0·56)	<0·0001	0·32 (0·20–0·51)	<0·0001
Age >72 years*	4·97 (3·5–7·06)	<0·0001	1·89 (1·12–3·20)	0·018
Charlson comorbidity index >2*	6·35 (4·01–10·06)	<0·0001	3·75 (1·99–7·07)	<0·0001
PaO_2/FiO_2 <100	2·18 (1·50–3·17)	<0·0001	2·89 (1·80–4·64)	<0·0001
CRP >100 mg/L	1·76 (1·21–2·55)	0·003	1·21 (0·76–1·92)	0·42
Lymphopenia (<580 lymphocytes per mm^3)*	3·08 (2·12–4·49)	<0·0001	3·05 (1·90–4·89)	<0·0001
Study	..	0·15	..	..

CRP=C-reactive protein. PaO_2/FiO_2=ratio of the arterial partial oxygen pressure divided by the fraction of inspired oxygen. *For continuous variables, the best cutoff was estimated from the receiver operating characteristic using the Youden Index.

Table 2: **Univariate and multivariate logistic regression analysis of variables associated with mortality in the individual patient-level data analysis of 895 patients**

The safety of anakinra was investigated as a secondary endpoint. Anakinra treatment was associated with elevation of liver function tests (pooled OR 3·00 [95% CI 0·26–34·66]; I^2 85%), as well as onset of leukopaenia (3·71 [0·49–27·84]; I^2 51%) and secondary infection (1·35 [0·59–3·10]; I^2 79%; appendix p 7). Thromboembolic events were reported in only two studies;[23,28] thus, no meta-analysis was done for this endpoint. Nevertheless, in both studies, anakinra did not increase the thromboembolic risk compared to standard-of-care treatment or placebo, or both.

Discussion

The results of this systematic review and meta-analysis indicate that, in patients admitted to hospital with pneumonia due to COVID-19, treatment with anakinra reduces mortality when compared with standard of care, with or without placebo. This survival benefit was most profound in patients with hyperinflammation and

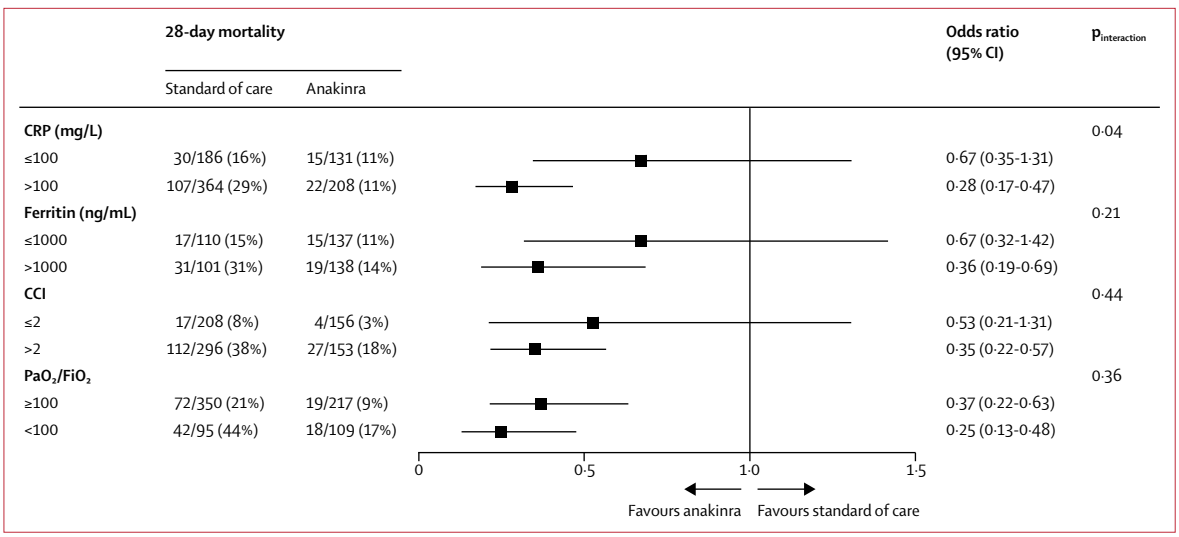


Figure 3: **Subgroup analysis of mortality in patients treated with anakinra versus those treated with standard of care**
p values of the interaction effect of the treatment on mortality, in each subgroup and among the studies are provided. CRP=C-reactive protein. CCI=Charlson comorbidity index. PaO_2/FiO_2=ratio of the arterial partial oxygen pressure divided by the fraction of inspired oxygen.

CRP concentrations higher than 100 mg/L. We also observed a non-significant increase in the risk of adverse events with anakinra.

Identifying and preventing unfavourable outcomes in patients with COVID-19 is a real challenge. Algorithms have been constructed and validated, taking into account various clinical variables, including older age, male sex, high body-mass index, and comorbidities.[32–35] Marked lymphopenia and elevated inflammatory biomarkers such as ferritin, IL-6, and CRP were first shown to be associated with severe disease in early reports of patients with COVID-19. IL-6 is a potent stimulator of CRP production by the liver.[36] Therefore, CRP concentrations probably represent the simplest biological test to indirectly evaluate the intensity of ongoing inflammation and a signal indicating a window of opportunity for targeted immunotherapy. Our results show a profound benefit of anakinra in patients with CRP concentrations higher than 100 mg/L.

Some patients with severe COVID-19 develop a hyperinflammatory phenotype known as a cytokine storm. Cytokine storm syndrome is a life-threatening condition requiring intensive care and with a high mortality rate, characterised by overwhelming systemic inflammation, with hyper-ferritinaemia, haemodynamic instability, and multiorgan failure. The trigger for cytokine storm syndrome might be extensive cell death, resulting in massive release of pro-inflammatory intracellular mediators and danger signals, notably including IL-1α.[37] These intracellular mediators in turn induce an uncontrolled immune response with continuous activation and expansion of immune cells, which produce large amounts of other pro-inflammatory cytokines such as IL-1β, IL-6, and IL-18, as well as interferon-γ (IFNγ) and tumour necrosis factor (TNF).[38] Not all patients experience a cytokine storm,[7] but even in those who do not, the pulmonary inflammatory response can be exacerbated and these patients might benefit from immunomodulating therapies.[5,6,8]

IL-1 is located upstream of IL-6 in the inflammation cascade,[39] and such a hierarchical process could explain why targeting IL-1 appears to be more efficient in hyperinflammatory forms of COVID-19 than IL-6 inhibition, which has already provided encouraging results in randomised controlled trials of patients with severe COVID-19 admitted to the intensive care unit.[40–42] Dexamethasone was the first immune modulator to show a clear survival benefit when administered to patients admitted to hospital with COVID-19 in need of oxygen supplementation in the RECOVERY trial; thus, after July, 2020, dexamethasone was incorporated into the standard of care for patients admitted to hospital with COVID-19.[43]

The cohort studies included in the current analysis of anakinra in patients with COVID-19 were not randomised and included patients receiving usual care as historical controls, mainly before implementation of dexamethasone as standard of care. Although the cohort design clearly has its limitations, the observed magnitude of the protective effect of anakinra was convincing enough to continue with additional studies, such as the open-label single-arm prospective SAVE study, which concluded that soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR)-guided anakinra treatment prevented onset of respiratory failure necessitating mechanical ventilation and reduced mortality.[29] The only randomised controlled trial completed so far was initiated by the French consortium CORIMUNO. It did not replicate the results observed in observational studies, and was prematurely interrupted because of assumed futility,[24]

suggesting that anakinra was not effective in reducing the need for non-invasive or mechanical ventilation or in preventing deaths in patients with COVID-19 and mild to moderate pneumonia. However, the 14-day mortality rate was 15% in the anakinra group compared to 24% in the usual care group, and the WHO Clinical Progression Scale was also suggestive of a beneficial effect of anakinra at day 14. Unfortunately, stopping for futility increases the risk of imbalance in prognostic factors and leaves the primary research question unanswered, especially when the decision to stop early does not follow a pre-specified stopping boundary. Additionally, the cutoff criterion chosen for CRP in the CORIMUNO study was relatively low (>25 mg/L), which suggests that a proportion of patients were not in the hyperinflammatory phase of COVID-19, during which anakinra is probably the most effective.[36]

In the present analysis, in contrast to published evidence supporting a synergistic effect of dexamethasone with IL-6 inhibition,[41,42] we did not observe a significant survival benefit of anakinra when co-administered with dexamethasone. For patients already under mechanical ventilation at the start of treatment, anakinra similarly did not show a significant survival benefit. However, decreased statistical power due to the small number of patients included in these subgroups probably contributed to these outcomes. It cannot be ruled out that anakinra has no additional benefit when co-administered with dexamethasone, or if anakinra is given too late, when severe organ failure is already apparent and organ support is needed. However, anakinra might be a safer alternative to dexamethasone when considering the risk of secondary infections, which was low in early reports but might rise after more widespread use of dexamethasone.[44,45] An additional benefit might be seen in specific populations, such as patients with diabetes, who are more susceptible to secondary infections and less likely to tolerate hyperglycaemia.[46] Indeed, our study showed a similar risk of secondary infections in the anakinra group compared with the control group, and a survival benefit of anakinra in a subgroup of patients with diabetes.

To the best of our knowledge, this is the first patient-level meta-analysis to investigate the effect of anakinra treatment in patients admitted to hospital with COVID-19, showing a significant reduction in mortality with anakinra, and characterising a subgroup of patients (those with CRP >100 mg/L) as the best candidates for this treatment. The main limitations of this meta-analysis are the retrospective observational design of the majority of studies included, raising concerns about bias and possible confounders among the compared groups, as well as the fact that most of the studies were done before dexamethasone was incorporated into standard-of-care treatment of patients admitted to hospital with COVID-19. Larger randomised trials are urgently needed to clarify the place of anakinra in the anti-COVID19 armamentarium; ongoing trials (appendix pp 3–4) include the REMAP-CAP trial (an international, multifactorial, adaptive platform randomly assigning patients to tocilizumab or sarilumab or anakinra or standard of care and comparing in-hospital mortality and days free of organ support to day 21 among the groups), and the placebo-controlled randomised controlled trial SAVE-MORE (NCT04680949) in Greece and Italy, comparing 28-day outcomes with anakinra versus placebo in patients already receiving standard-of-care treatment for COVID-19.

Contributors

EKy did the literature search and study selection, participated in data analysis, and drafted the manuscript. EJG-B conceptualised the study, and participated in the literature search and study selection. MKy contributed to data analysis. GH drafted the manuscript. TH, GCa, AG, PP, GCh, GK, EP, MG, RC, EKo, MKo, HB, DM, AB, and LD provided clinical data and revised the manuscript for important intellectual content. JE-O, MC, FV, MGN, and JWMvdM revised the manuscript for important intellectual content. All authors gave approval for the version to be published.

Declaration of interests

EJG-B has received honoraria from AbbVie USA, Abbott CH, Biotest Germany, Brahms, InflaRx, MSD Greece, XBiotech, and Angelini Italy; independent educational grants from AbbVie, Abbott CH, Astellas Pharma Europe, AxisShield, bioMérieux, InflaRx, the Medicines Company and XBiotech; and funding from the FrameWork 7 program HemoSpec (granted to the National and Kapodistrian University of Athens), the Horizon2020 Marie-Curie Project European Sepsis Academy (granted to the National and Kapodistrian University of Athens), and the Horizon 2020 European Grant ImmunoSep (granted to the Hellenic Institute for the Study of Sepsis). MG has received speakers' fees and unrestricted grants from Novartis and Sobi. PP, MKo, and EKo are funded by a COVID-19 grant paid to the Radboud University Medical Center (Radboudumc). JE-O is a co-founder, shareholder, and CSO of ViroGates, Denmark, and named inventor on patents on suPAR owned by Copenhagen University Hospital Hvidovre, Denmark. GK has received from ROCHE-CHUGAI Research Grants (<€20 000), fees from Sobi France for scientific presentations (<€4000) and participated in a SOBI Advisory Board on COVID (unpaid) and in an OLATEC Monitoring Board (unpaid). GCa has received speakers' and consulting fees from Novartis and Sobi. LD has received grants (paid to LD's institution outside the current work) from AbbVie, Bristol-Myers Squibb, Celgene, GlaxoSmithKline, Janssen, Kiniksa, Merk Sharp & Dohme, Mundipharma Pharmaceuticals, Novartis, Pfizer, Roche, Sanofi Genzyme, and Sobi; and consulting fees from AbbVie, Amgen, Biogen, Bristol-Myers Squibb, Celltrion, Galapagos, GlaxoSmithKline, Kiniksa, Novartis, Pfizer, Roche, Sanofi-Genzyme, and Sobi. GH reports consultancy fees from Bristol-Myers Squibb, Lilly, Novartis; speakers' fees from AbbVie, Bristol-Myers-Squibb, Celgene, Lilly, Novartis, Pfizer, Roche, Sanofi-Aventis; support for attending meetings from Bristol-Myers-Squibb, Fresenius-Kabi, Janssen-Cilag, Lilly, Mylan, Roche, UCB; and participation on advisory boards for Bristol-Myers-Squibb and Lilly. FV has received (via the Institut de Recherche pour le Développement) Horizon 2020-EDCTP-European Grants: PANDORA and ITAIL-COVID. All other authors declare no competing interests.

Data sharing

Data collected for this study, including de-identified individual participant data, will be made available following publication. Requests for data can be made to the corresponding author, outlining specific data needs, analysis plans and dissemination plans. These requests will be reviewed by a steering committee of the International Collaborative Group for Anakinra in COVID-19. Data will be shared after a data access agreement is signed, for any proposed purpose approved by the steering committee and all data will be de-identified and protected health information stripped.

References

1 WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019?gclid=Cj0KCQiAhs79BRD0ARIsAC6XpaXhxHeN64r7-j5rvv0ZDtNGxNkA0e2EWCAUr8QWWj-qi_PPrXOljroaAjXBEALw_wcB. (accessed June 28, 2021).

2 Mason RJ. Thoughts on the alveolar phase of COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2020; **319:** L115–20.

3 Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* 2020; **395:** 1417–18.

4 Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020; **395:** 1033–34.

5 Jouan Y, Baranek T, Si-Tahar M, Paget C, Guillon A. Lung compartmentalization of inflammatory biomarkers in COVID-19-related ARDS. *Crit Care* 2021; **25:** 120.

6 Bendib I, Beldi-Ferchiou A, Schlemmer F, et al. Alveolar compartmentalization of inflammatory and immune cell biomarkers in pneumonia-related ARDS. *Crit Care* 2021; **25:** 23.

7 Kox M, Waalders NJB, Kooistra EJ, Gerretsen J, Pickkers P. Cytokine levels in critically ill patients with COVID-19 and other conditions. *JAMA* 2020; **324:** 1565–67.

8 McGonagle D, Ramanan AV, Bridgewood C. Immune cartography of macrophage activation syndrome in the COVID-19 era. *Nat Rev Rheumatol* 2021; **17:** 145–57.

9 Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, et al. Interleukin-1 receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of macrophage activation syndrome: reanalysis of a prior phase III trial. *Crit Care Med* 2016; **44:** 275–81.

10 Strati P, Ahmed S, Kebriaei P, et al. Clinical efficacy of anakinra to mitigate CAR T-cell therapy-associated toxicity in large B-cell lymphoma. *Blood Adv* 2020; **4:** 3123–27.

11 Giavridis T, van der Stegen SJC, Eyquem J, Hamieh M, Piersigilli A, Sadelain M. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nat Med* 2018; **24:** 731–38.

12 Navarro-Millán I, Sattui SE, Lakhanpal A, Zisa D, Siegel CH, Crow MK. Use of anakinra to prevent mechanical ventilation in severe COVID-19: a case series. *Arthritis Rheumatol* 2020; **72:** 1990–97.

13 Pontali E, Volpi S, Antonucci G, et al. Safety and efficacy of early high-dose IV anakinra in severe COVID-19 lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 2020; **146:** 213–15.

14 Aouba A, Baldolli A, Geffray L, et al. Targeting the inflammatory cascade with anakinra in moderate to severe COVID-19 pneumonia: case series. *Ann Rheum Dis* 2020; **79:** 1381–82.

15 Dimopoulos G, de Mast Q, Markou N, et al. Favorable anakinra responses in severe covid-19 patients with secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Cell Host Microbe* 2020; **28:** 117–23.

16 Stewart LA, Clarke M, Rovers M, et al. Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses of individual participant data: the PRISMA-IPD Statement. *JAMA* 2015; **313:** 1657–65.

17 Stang A. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. *Eur J Epidemiol* 2010; **25:** 603–05.

18 Izcovich A, Ragusa MA, Tortosa F, et al. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: a systematic review. *PLoS One* 2020; **15:** e0241955.

19 Cheng L, Li H, Li L, et al. Ferritin in the coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. *J Clin Lab Anal* 2020; **34:** e23618.

20 Zhou W, Qin X, Hu X, Lu Y, Pan J. Prognosis models for severe and critical COVID-19 based on the Charlson and Elixhauser comorbidity indices. *Int J Med Sci* 2020; **17:** 2257–63.

21 ARDS Definition Task Force. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012; **307:** 2526–33.

22 Cauchois R, Koubi M, Delarbre D, et al. Early IL-1 receptor blockade in severe inflammatory respiratory failure complicating COVID-19. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020; **117:** 18951–53.

23 Huet T, Beaussier H, Voisin O, et al. Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study. *Lancet Rheumatol* 2020; **2:** e393–400.

24 The CORIMUNO-19 Collaborative group. Effect of anakinra versus usual care in adults in hospital with COVID-19 and mild-to-moderate pneumonia (CORIMUNO-ANA-1): a randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 2021; **9:** 295–304.

25 Bozzi G, Mangioni D, Minoia F, et al. Anakinra combined with methylprednisolone in patients with severe COVID-19 pneumonia and hyperinflammation: an observational cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2021; **147:** 561–566.

26 Cavalli G, Larcher A, Tomelleri A, et al. Interleukin-1 and interleukin-6 inhibition compared with standard management in patients with COVID-19 and hyperinflammation: a cohort study. *Lancet Rheumatol* 2021; **3:** e253–61.

27 Pontali E, Volpi S, Signori A, et al. Efficacy of early anti-inflammatory treatment with high doses of intravenous anakinra with or without glucocorticoids in patients with severe COVID-19 pneumonia. *J Allergy Clin Immunol.* 2021; **147:** 1217–25.

28 Kooistra EJ, Waalders NJB, Grondman I, et al. Anakinra treatment in critically ill COVID-19 patients: a prospective cohort study. *Crit Care* 2020; **24:** 688.

29 Kyriazopoulou E, Panagopoulos P, Metallidis S, et al. An open label trial of anakinra to prevent respiratory failure in COVID-19. *eLife* 2021; **10:** e66125.

30 Balkhair A, Al-Zakwani I, Al Busaidi M, et al. Anakinra in hospitalized patients with severe COVID-19 pneumonia requiring oxygen therapy: results of a prospective, open-label, interventional study. *Int J Infect Dis* 2021; **103:** 288–96.

31 Cavalli G, De Luca G, Campochiaro C, et al. Interleukin-1 blockade with high-dose anakinra in patients with COVID-19, acute respiratory distress syndrome, and hyperinflammation: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol* 2020; **2:** e325–31.

32 Sperrin M, McMillan B. Prediction models for covid-19 outcomes. *BMJ* 2020; **371:** m3777.

33 Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; **395:** 497–506.

34 Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* 2020; **130:** 2620–29.

35 Jimenez-Solem E, Petersen TS, Hansen C, et al. Developing and validating COVID-19 adverse outcome risk prediction models from a bi-national European cohort of 5594 patients. *Sci Rep* 2021; **11:** 3246.

36 Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Front Immunol* 2018; **9:** 754.

37 Cavalli G, Colafrancesco S, Emmi G, et al. Interleukin 1α: a comprehensive review on the role of IL-1α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev* 2021; **20:** 102763.

38 Caricchio R, Gallucci M, Dass C, et al. Preliminary predictive criteria for COVID-19 cytokine storm. *Ann Rheum Dis* 2021; **80:** 88–95.

39 Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011; **117:** 3720–32.

40 Campochiaro C, Della-Torre E, Cavalli G, et al. Efficacy and safety of tocilizumab in severe COVID-19 patients: a single-centre retrospective cohort study. *Eur J Intern Med* 2020; **76:** 43–49.

41 The RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet* 2021; **397:** 1637–45.

42 Gordon AC, Mouncey PR, Al-Beidh F, et al. Interleukin-6 receptor antagonists in critically ill patients with Covid-19. *N Engl J Med* 2021; **384:** 1491–502.

43 The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. *N Engl J Med* 2021; **384:** 693–704.

44 Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect* 2020; **81:** 266–75.

45 Bassetti M, Kollef MH, Timsit JF. Bacterial and fungal superinfections in critically ill patients with COVID-19. *Intensive Care Med* 2020; **46:** 2071–74.

46 Cavalli G, Dagna L. The right place for IL-1 inhibition in COVID-19. *Lancet Respir Med* 2021; **9:** 223–24.

Table des figures

Figure 1: Classification usuelle des microangiopathies thrombotiques 13
Figure 2: Thrombi diffus dans la microcirculation 14
Figure 3: Dates clés dans la compréhension de la physiopathologie du PTT (adapté de Roose *et al*, 2020[15]) 15
Figure 4: Structure d'ADAMTS13, avec les conformations ouvertes et fermées et interaction avec le vWF (adapté de Roose et Joly[15]) 19
Figure 5: Le PTT acquis sans autoanticorps (adapté de Joly *et al*[53]) 20
Figure 6: du déficit en ADAMTS13 à triade des MAT 21
Figure 7: Classification des SHU (adapté de Fakhouri *et al*, Lancet 2017) 26
Figure 8: Cytologie médullaire mettant en évidence des cellules carcinomateuses, chez une patiente prise en charge pour une MAT sévère. 27
Figure 9: Eléments permettant de discriminer les MAT post-chimiothérapie des MAT paranéoplasiques (adapté de Grangé *et al*[80]) 28
Figure 10 : Scores de prédiction d'un déficit en ADAMTS13 (PNDS 2023). 29
Figure 11: Facteurs pronostiques identifiés dans la littérature scientifique par Scully *et al*, BJH 2023 (essentiellement issus de l'ère pré-Caplacizumab) 32
Figure 12: L'endothélium est une monocouche cellulaire à l'interface du sang et des tissus 41
Figure 13: Au sein d'un même organe (ici le rein), il peut exister différents phénotypes de cellules endothéliales (adapté de Jourde-Chiche *et al*, Nature Review Nephrol, 2019[140]) 42
Figure 14: Propriétés des microvésicules endothéliales (d'après Dignat-George *et al*[143]) 44
Figure 15: Les corps de Weibel Palade ont une forme de "cigare" (adapté de Goligorski *et al*[147]) 45
Figure 16: Principaux acteurs moléculaires impliqués au cours de l'activation d'une cellule endothéliale conduisant à la dégranulation des CWP et à la majoration de la perméabilité endothéliale 46
Figure 17: Représentation schématique de la VE-Cadhérine (adapté de Seung-Sik Rho *et al*[183]). p120 : p120-caténine, α : α-caténine, β : β-caténine. 53
Figure 18: La réorganisation du cytosquelette modifie l'organisation des jonctions adhérentes et influe sur la perméabilité (adapté de Seung-Sik Rho *et al*[183]). 54
Figure 19: Le PHRC ENDO13 a étudié le profil de "vasculocompétence" des patients atteints de PTTi 57
Figure 20: Les plasmas PTTi induisent une libération de vWF plus importante que les plasmas contrôles (adapté de Tellier *et al*, Haematologica 2022) 59
Figure 21: Déclenchement du PTT chez des souris KO ADAMTS13 par injection du vWF ou par induction de dégranulation endothéliale 60
Figure 22: le modèle du babouin 61
Figure 23: l'injection d'histones à des zebrafish KO ADAMTS13 induit une MAT de sévérité modérée 62

Figure 24: Schéma récapitulant les différents facteurs déclenchant l'activation endothéliale avec les conséquences phénotypiques 66
Figure 25: Cascade d'activation du complément (adapté de Noris, M. *et al*. Nat. Rev. Nephrol. 2012[278]) 67
Figure 26: Le C3 est la protéine centrale de la cascade du complément (adapté de Schmidt *et al*, Blood 2022[280]) 68
Figure 27: Activation et inhibition du complément en fonction des différentes surfaces cellulaires (figure aimablement fournie par le Dr Juliette Léon) 68
Figure 28: Dans le SHU atypique, une agression endothéliale sur un terrain d'activation dérégulée de la voie alterne du complément conduit à des microthromboses diffuses dans le rein 69
Figure 29: Les APL induisent une activation endothéliale directe et complément-médiée (adapté de Schmidt *et al*, Blood 2022)[280] 70
Figure 30: Colocalisation entre les UL-vWF et le C3 (adapté de Turner *et al*, 2015)[305]73
Figure 31: Synthèse mécanistique proposée par Bettoni *et al*[299] 74
Figure 32: L'hémolyse massive induit une accumulation d'hème libre, qui participe directement et indirectement à l'agression endothéliale 76
Figure 33: Le complément, l'hème et les nucléosomes sont des boucles d'amplification au cours du PTT 77
Figure 34: Le couple « stress sur terrain prédisposant » est impliqué dans des proportions variables dans d'autres MAT (adapté de Jodele *et al*)[336] 79
Figure 35: Le couplage phénotype endothélial - nature des activateurs est une piste pour comprendre le tropisme des atteintes d'organes 80
Figure 36: Illustration des deux axes de recherche concernant le PTT au cours de ma thèse 104
Figure 37: Frise chronologique des deux premières années de PhD 104
Figure 38: Proposition de schéma sur les conséquences des anomalies jonctionnelles endothéliales au cours du PTT (l'épaisseur des flèches est associée à notre degré de confiance dans les liens de causalité illustrés) 127
Figure 39: l'ITF1697 inhibe le flux calcique induit par le VEGF, la thrombine et les plasmas de patients PTT. 133
Figure 40: Effet de l'ITF1697 sur la libération de l'endothéline-1 en condition de culture statique. 134
Figure 41: Projet initial d'induction du PTT chez les souris KO ADAMTS13 135
Figure 42: la Shigatoxine 2 à forte posologie n'a pas permis de déclencher un PTT. 136
Figure 43: Echecs de différents activateurs pour déclencher un PTT chez les souris KO *ADAMTS13* 136
Figure 44: Le LPS induit une thrombopénie profonde chez les souris 137
Figure 45: l'IL-1α et l'IL-1β induisent une dégranulation endothéliale calcium-dépendante (adapté de Muller et al, Blood, en révision) 138
Figure 46: Les IL-1α et IL-1β induisent une thrombopénie profonde chez les souris KO ADAMTS13 (adapté de Muller et al, Blood, en révision) 139
Figure 47: Absence d'effet de l'ITF1697 sur la thrombopénie induite par l'IL-1β in vivo. 140
Figure 48: Analyse histologique des myocardes des souris ayant reçu de l'IL-1β 140

Figure 49: Structure du SARS-CoV-2 144
Figure 50: L'endothélium au cours du COVID-19 sévère (adapté de Teuwen *et al*[162]) 145
Figure 51: Mécanismes majorant la perméabilité endothéliale au cours du COVID-19 (Adapté de Teuwen *et al*[162]) 147
Figure 52: Thrombi dans une artériole et une veinule pulmonaire chez un patient atteint de COVID-19, image adaptée de Bonaventura *et al*, 2021[381] (a : coloration HE, b : immunomarquage CD61 pour cibler les plaquettes) 148
Figure 53: Les différents acteurs de l'immunothrombose (cellules endothéliales, monocytes, PNN & NETs, plaquettes, microvésicules, protéines du complément et cytokines). Adapté de Bonaventura *et al*, Nature Reviews Immunology, 2021.[381] 150
Figure 54: la famille des IL-1, avec les sous-familles IL-1, IL-18 et IL-36 (adapté de Mantovani *et al*, 2019) 151
Figure 55: Priming et activation de l'inflammasome NLRP3 (adapté de Toldo, Abbate *et al*, 2021[394]) 153
Figure 56: Activation de l'inflammasome au cours du COVID-19, proposition de synthèse 155
Figure 57: Une phase "inflammatoire" a été évoquée depuis le début de la pandémie (adapté de Siddiqi *et al*[405]). 156
Figure 58 : caractéristique des patients (figure non présente dans l'article original) 158
Figure 59: Critères de jugement de notre étude rétrospective 159

Références bibliographiques

1. George, J. N. & Nester, C. M. Syndromes of thrombotic microangiopathy. *N. Engl. J. Med.* **371**, 654–666 (2014).

2. Amorosi, E. L. & Ultmann, J. E. THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA: REPORT OF 16 CASES AND REVIEW OF THE LITERATURE. *Medicine* **45**, 139 (1966).

3. Moake, J. L. *et al.* Unusually large plasma factor VIII:von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* **307**, 1432–1435 (1982).

4. Fujikawa, K., Suzuki, H., McMullen, B. & Chung, D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* **98**, 1662–1666 (2001).

5. Zheng, X. *et al.* Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biol. Chem.* **276**, 41059–41063 (2001).

6. Lotta, L. A., Garagiola, I., Palla, R., Cairo, A. & Peyvandi, F. ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum. Mutat.* **31**, 11–19 (2010).

7. Scully, M. *et al.* Regional UK TTP registry: correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features. *Br. J. Haematol.* **142**, 819–826 (2008).

8. Tsai, H. M. & Lian, E. C. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1585–1594 (1998).

9. Rubinstein, M. A., Kagan, B. M., Macgillviray, M. H., Merliss, R. & Sacks, H. Unusual remission in a case of thrombotic thrombocytopenic purpura syndrome following fresh blood exchange transfusions. *Ann Intern Med* **51**, 1409–1419 (1959).

10. George, J. N. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010. *Blood* **116**, 4060–4069 (2010).

11. Coppo, P. & French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies. Treatment of autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura in the more severe forms. *Transfus. Apher. Sci.* **56**, 52–56 (2017).

12. Peyvandi, F. *et al.* Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N. Engl. J. Med.* **374**, 511–522 (2016).

13. Scully, M. *et al.* Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N. Engl. J. Med.* **380**, 335–346 (2019).

14. Poullin, P., Bornet, C., Veyradier, A. & Coppo, P. Caplacizumab to treat immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Drugs Today* **55**, 367–376 (2019).

15. E, R. & Bs, J. Current and Future Perspectives on ADAMTS13 and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Hamostaseologie* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32726827/ (2020) doi:10.1055/a-1171-0473.

16. Reese, J. A. *et al.* Children and adults with thrombotic thrombocytopenic purpura associated with severe, acquired Adamts13 deficiency: comparison of incidence, demographic and clinical features. *Pediatr Blood Cancer* **60**, 1676–1682 (2013).

17. Mariotte, E. *et al.* Epidemiology and pathophysiology of adulthood-onset thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency (thrombotic thrombocytopenic purpura): a cross-sectional analysis of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol* **3**, e237-245 (2016).

18. Bayer, G. *et al.* Etiology and Outcomes of Thrombotic Microangiopathies. *Clin J Am Soc Nephrol* **14**, 557–566 (2019).

19. Terrell, D. R. *et al.* The incidence of thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: all patients, idiopathic patients, and patients with severe ADAMTS-13 deficiency. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1432–1436 (2005).

20. Yagi, H., Matsumoto, M. & Fujimura, Y. Paradigm shift of childhood thrombotic thrombocytopenic purpura with severe ADAMTS13 deficiency. *Presse Med* **41**, e137-155 (2012).

21. Coppo, P. *et al.* HLA-DRB1*11: a strong risk factor for acquired severe ADAMTS13 deficiency-related idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in Caucasians. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 856–859 (2010).

22. Camilleri, R. S. *et al.* Prevalence of the ADAMTS-13 missense mutation R1060W in late onset adult thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* **6**, 331–338 (2008).

23. Rieger, M. *et al.* ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. *Blood* **106**, 1262–1267 (2005).

24. Matsuyama, T. *et al.* Heterogeneous pathogenic processes of thrombotic microangiopathies in patients with connective tissue diseases. *Thromb. Haemost.* **102**, 371–378 (2009).

25. Assink, K. *et al.* Mutation analysis and clinical implications of von Willebrand factor-cleaving protease deficiency. *Kidney Int.* **63**, 1995–1999 (2003).

26. Matsumoto, M. *et al.* Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood* **103**, 1305–1310 (2004).

27. Galbusera, M., Noris, M. & Remuzzi, G. Inherited thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* **94**, 166–170 (2009).

28. Fujimura, Y. *et al.* Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J. Thromb. Haemost.* **9 Suppl 1**, 283–301 (2011).

29. Lotta, L. A. *et al.* Residual plasmatic activity of ADAMTS13 is correlated with phenotype severity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **120**, 440–448 (2012).

30. Lotta, L. A., Wu, H. M., Musallam, K. M. & Peyvandi, F. The emerging concept of residual ADAMTS13 activity in ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Rev.* **27**, 71–76 (2013).

31. Sadler, J. E. von Willebrand factor assembly and secretion. *J. Thromb. Haemost.* **7 Suppl 1**, 24–27 (2009).

32. Lenting, P. J., Christophe, O. D. & Denis, C. V. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* **125**, 2019–2028 (2015).

33. Y, O. *et al.* Regulation of von Willebrand factor by ADAMTS13 ameliorates lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *International journal of hematology* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37759076/ (2023) doi:10.1007/s12185-023-03668-x.

34. Soejima, K. *et al.* A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J. Biochem.* **130**, 475–480 (2001).

35. Turner, N., Nolasco, L., Tao, Z., Dong, J.-F. & Moake, J. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 1396–1404 (2006).

36. Liu, L. *et al.* Platelet-derived VWF-cleaving metalloprotease ADAMTS-13. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 2536–2544 (2005).

37. Manea, M., Tati, R., Karlsson, J., Békássy, Z. D. & Karpman, D. Biologically active ADAMTS13 is expressed in renal tubular epithelial cells. *Pediatr. Nephrol.* **25**, 87–96 (2010).

38. Furlan, M., Robles, R., Morselli, B., Sandoz, P. & Lämmle, B. Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Haemost.* **81**, 8–13 (1999).

39. South, K. *et al.* Conformational activation of ADAMTS13. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 18578–18583 (2014).

40. E, R. *et al.* An open conformation of ADAMTS-13 is a hallmark of acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29222940/ (2018) doi:10.1111/jth.13922.

41. Jestin, M. *et al.* Preemptive rituximab prevents long-term relapses in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **132**, 2143–2153 (2018).

42. Roose, E. *et al.* Open ADAMTS13, induced by antibodies, is a biomarker for subclinical immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **136**, 353–361 (2020).

43. Thomas, M. R., de Groot, R., Scully, M. A. & Crawley, J. T. B. Pathogenicity of Anti-ADAMTS13 Autoantibodies in Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *EBioMedicine* **2**, 942–952 (2015).

44. Feys, H. B. *et al.* ADAMTS-13 plasma level determination uncovers antigen absence in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura and ethnic differences. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 955–962 (2006).

45. Luken, B. M. *et al.* The spacer domain of ADAMTS13 contains a major binding site for antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Haemost.* **93**, 267–274 (2005).

46. Casina, V. C. *et al.* High-resolution epitope mapping by HX MS reveals the pathogenic mechanism and a possible therapy for autoimmune TTP syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 9620–9625 (2015).

47. Zheng, X. L. *et al.* Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* **95**, 1555–1562 (2010).

48. Ferrari, S. *et al.* Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity. *Blood* **109**, 2815–2822 (2007).

49. Ferrari, S. *et al.* IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 1703–1710 (2009).

50. Mancini, I. *et al.* ADAMTS13-specific circulating immune complexes as potential predictors of relapse in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur. J. Intern. Med.* **39**, 79–83 (2017).

51. Roose, E. *et al.* Anti-ADAMTS13 Autoantibodies against Cryptic Epitopes in Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Thromb Haemost* **118**, 1729–1742 (2018).

52. Aa, N. *et al.* ADAMTS-13 glycans and conformation-dependent activity. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28370891/ (2017) doi:10.1111/jth.13688.

53. Joly, B. S., Roose, E., Coppo, P., Vanhoorelbeke, K. & Veyradier, A. ADAMTS13 conformation is closed in non-immune acquired thrombotic thrombocytopenic purpura of unidentified pathophysiology. *Haematologica* **108**, 638–644 (2023).

54. Tsai, H. M., Sussman, I. I. & Nagel, R. L. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood* **83**, 2171–2179 (1994).

55. Zander, C. B., Cao, W. & Zheng, X. L. ADAMTS13 and von Willebrand factor interactions. *Curr. Opin. Hematol.* **22**, 452–459 (2015).

56. Asada, Y., Sumiyoshi, A., Hayashi, T., Suzumiya, J. & Kaketani, K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb. Res.* **38**, 469–479 (1985).

57. López, J. A. & Dong, J. Shear stress and the role of high molecular weight von Willebrand factor multimers in thrombus formation. *Blood Coagul Fibrinolysis* **16 Suppl 1**, S11-16 (2005).

58. Veyradier, A. & Meyer, D. Thrombotic thrombocytopenic purpura and its diagnosis. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 2420–2427 (2005).

59. Scully, M. *et al.* Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br. J. Haematol.* **158**, 323–335 (2012).

60. Kremer Hovinga, J. A. *et al.* Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17020 (2017).

61. Bakshi, R., Shaikh, Z. A., Bates, V. E. & Kinkel, P. R. Thrombotic thrombocytopenic purpura: brain CT and MRI findings in 12 patients. *Neurology* **52**, 1285–1288 (1999).

62. Burrus, T. M., Wijdicks, E. F. M. & Rabinstein, A. A. Brain lesions are most often reversible in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Neurology* **73**, 66–70 (2009).

63. Sarode, R. Atypical presentations of thrombotic thrombocytopenic purpura: a review. *J Clin Apher* **24**, 47–52 (2009).

64. Benhamou, Y. *et al.* Cardiac troponin-I on diagnosis predicts early death and refractoriness in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *J. Thromb. Haemost.* **13**, 293–302 (2015).

65. Hughes, C. *et al.* Cardiac involvement in acute thrombotic thrombocytopenic purpura: association with troponin T and IgG antibodies to ADAMTS 13. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 529–536 (2009).

66. George, J. N. Clinical practice. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1927–1935 (2006).

67. Nokes, T., George, J. N., Vesely, S. K. & Awab, A. Pulmonary involvement in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur. J. Haematol.* **92**, 156–163 (2014).

68. Prevel, R. *et al.* Immune thrombotic thrombocytopenic purpura in older patients: prognosis and long-term survival. *Blood* **134**, 2209–2217 (2019).

69. Grall, M. *et al.* Thrombotic thrombocytopenic purpura misdiagnosed as autoimmune cytopenia: Causes of diagnostic errors and consequence on outcome. Experience of the French thrombotic microangiopathies reference centre. *Am. J. Hematol.* **92**, 381–387 (2017).

70. Noël, N. *et al.* Hemolysis and schistocytosis in the emergency department: consider pseudothrombotic microangiopathy related to vitamin B12 deficiency. *QJM* **106**, 1017–1022 (2013).

71. Dundas, S. *et al.* The central Scotland Escherichia coli O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 923–931 (2001).

72. Shiga Toxin–Producing Escherichia coli and the Hemolytic–Uremic Syndrome | NEJM. https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra2108739.

73. Hunt, B. J., Lämmle, B., Nevard, C. H., Haycock, G. B. & Furlan, M. von Willebrand factor-cleaving protease in childhood diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *Thromb. Haemost.* **85**, 975–978 (2001).

74. Kremer Hovinga, J. A. & Lämmle, B. Role of ADAMTS13 in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2012**, 610–616 (2012).

75. Lo, N. C., Turner, N. A., Cruz, M. A. & Moake, J. Interaction of Shiga toxin with the A-domains and multimers of von Willebrand Factor. *J. Biol. Chem.* **288**, 33118–33123 (2013).

76. Noris, M. & Remuzzi, G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1676–1687 (2009).

77. Tsai, H. M., Rice, L., Sarode, R., Chow, T. W. & Moake, J. L. Antibody inhibitors to von Willebrand factor metalloproteinase and increased binding of von Willebrand factor to platelets in ticlopidine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann. Intern. Med.* **132**, 794–799 (2000).

78. Largeau, B., Thoreau, B., Grangé, S., Jonville-Béra, A.-P. & Halimi, J.-M. Thrombotic microangiopathy associated with anticancer and immune system targeting drugs: New insights from real-world data using the WHO pharmacovigilance database. *J Intern Med* **294**, 665–678 (2023).

79. Biedermann, B. C. Vascular endothelium and graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol* **21**, 129–138 (2008).

80. S, G. & P, C. Thrombotic microangiopathies and antineoplastic agents. *Nephrologie & therapeutique* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28577731/ (2017) doi:10.1016/j.nephro.2017.01.016.

81. Benjamin, M. *et al.* Frequency and significance of HIV infection among patients diagnosed with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1129–1137 (2009).

82. Gunther, K., Garizio, D. & Nesara, P. ADAMTS13 activity and the presence of acquired inhibitors in human immunodeficiency virus-related thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion* **47**, 1710–1716 (2007).

83. Malak, S. *et al.* Human immunodeficiency virus-associated thrombotic microangiopathies: clinical characteristics and outcome according to ADAMTS13 activity. *Scand. J. Immunol.* **68**, 337–344 (2008).

84. Allford, S. L., Hunt, B. J., Rose, P., Machin, S. J., & Haemostasis and Thrombosis Task Force, British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of the thrombotic microangiopathic haemolytic anaemias. *Br. J. Haematol.* **120**, 556–573 (2003).

85. Moatti-Cohen, M. *et al.* Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **119**, 5888–5897 (2012).

86. M, S. *et al.* Thrombotic thrombocytopenic purpura and pregnancy: presentation, management, and subsequent pregnancy outcomes. *Blood* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24859360/ (2014) doi:10.1182/blood-2014-02-553131.

87. Liu, A. *et al.* Reduced sensitivity of PLASMIC and French scores for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura in older individuals. *Transfusion* **61**, 266–273 (2021).

88. Peyvandi, F. *et al.* ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 631–640 (2010).

89. Meyer, S. C., Sulzer, I., Lämmle, B. & Kremer Hovinga, J. A. Hyperbilirubinemia interferes with ADAMTS-13 activity measurement by FRETS-VWF73 assay: diagnostic relevance in patients suffering from acute thrombotic microangiopathies. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 866–867 (2007).

90. Scully, M. *et al.* A British Society for Haematology Guideline: Diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol* (2023) doi:10.1111/bjh.19026.

91. Sánchez-Luceros, A. *et al.* von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb. Haemost.* **92**, 1320–1326 (2004).

92. Reiter, R. A., Knöbl, P., Varadi, K. & Turecek, P. L. Changes in von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity after infusion of desmopressin. *Blood* **101**, 946–948 (2003).

93. Alwan, F. *et al.* Presenting ADAMTS13 antibody and antigen levels predict prognosis in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **130**, 466–471 (2017).

94. Benhamou, Y. *et al.* Development and validation of a predictive model for death in acquired severe ADAMTS13 deficiency-associated idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: the French TMA Reference Center experience. *Haematologica* **97**, 1181–1186 (2012).

95. Nichols, L., Berg, A., Rollins-Raval, M. A. & Raval, J. S. Cardiac injury is a common postmortem finding in thrombotic thrombocytopenic purpura patients: is empiric cardiac monitoring and protection needed? *Ther Apher Dial* **19**, 87–92 (2015).

96. Hughes, C. *et al.* Cardiac involvement in acute thrombotic thrombocytopenic purpura: association with troponin T and IgG antibodies to ADAMTS 13. *J Thromb Haemost* **7**, 529–536 (2009).

97. Benhamou, Y. *et al.* Le dosage de la troponine-I au diagnostic est prédictif de la survenue de décès et d'une forme réfractaire dans le purpura thrombotique thrombocytopénique acquis de l'adulte : expérience du Centre national des microangiopathies thrombotiques. *La Revue de Médecine Interne* **35**, A88 (2014).

98. Balasubramaniyam, N. *et al.* Cardiovascular Complications and Their Association With Mortality in Patients With Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Am J Med* (2020) doi:10.1016/j.amjmed.2020.06.020.

99. M, J. *et al.* Relationship between ADAMTS13 activity in clinical remission and the risk of TTP relapse. *British journal of haematology* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18397340/ (2008) doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07107.x.

100. Cuker, A. *et al.* Redefining outcomes in immune TTP: an international working group consensus report. *Blood* **137**, 1855–1861 (2021).

101. Rock, G. A. *et al.* Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N. Engl. J. Med.* **325**, 393–397 (1991).

102. Soucemarianadin, M. *et al.* Twice-daily therapeutical plasma exchange-based salvage therapy in severe autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura: the French TMA Reference Center experience. *Eur. J. Haematol.* **97**, 183–191 (2016).

103. E, T. *et al.* Annual incidence and severity of acute episodes in hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33649760/ (2021) doi:10.1182/blood.2020009801.

104. F, P. *et al.* ADAMTS13 content in plasma-derived factor VIII/von Willebrand factor concentrates. *American journal of hematology* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23813910/ (2013) doi:10.1002/ajh.23527.

105. A, T., C, V., S, O., O, D. P. & M, S. Pharmacokinetics of plasma infusion in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30475428/ (2019) doi:10.1111/jth.14345.

106. Froissart, A. *et al.* Efficacy and safety of first-line rituximab in severe, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with a suboptimal response to plasma exchange. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Crit. Care Med.* **40**, 104–111 (2012).

107. Fakhouri, F. *et al.* Efficiency of curative and prophylactic treatment with rituximab in ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura: a study of 11 cases. *Blood* **106**, 1932–1937 (2005).

108. Vazquez-Mellado, A. *et al.* More about low-dose rituximab and plasma exchange as front-line therapy for patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology* **21**, 311–316 (2016).

109. Scully, M. *et al.* A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **118**, 1746–1753 (2011).

110. Scully, M. *et al.* Remission in acute refractory and relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura following rituximab is associated with a reduction in IgG antibodies to ADAMTS-13. *Br. J. Haematol.* **136**, 451–461 (2007).

111. Owattanapanich, W., Wongprasert, C., Rotchanapanya, W., Owattanapanich, N. & Ruchutrakool, T. Comparison of the Long-Term Remission of Rituximab and Conventional Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* (2019) doi:10.1177/1076029618825309.

112. McDonald, V., Manns, K., Mackie, I. J., Machin, S. J. & Scully, M. A. Rituximab pharmacokinetics during the management of acute idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* **8**, 1201–1208 (2010).

113. Bergstrand, M. *et al.* Caplacizumab Model-Based Dosing Recommendations in Pediatric Patients With Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *J Clin Pharmacol* **62**, 409–421 (2022).

114. Sargentini-Maier, M. L. *et al.* Clinical pharmacology of caplacizumab for the treatment of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Expert Rev Clin Pharmacol* **12**, 537–545 (2019).

115. Coppo, P., Joly, B. S. & Microangiopathies (CNR-MAT), F. R. C. for T. Caplacizumab: A game changer also in pregnancy-associated immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura? *British Journal of Haematology* **202**, 725–727 (2023).

116. Scully, M. *et al.* Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *New England Journal of Medicine* (2019) doi:10.1056/NEJMoa1806311.

117. Dutt, T. *et al.* Real-world experience with caplacizumab in the management of acute TTP. *Blood* **137**, 1731–1740 (2021).

118. Völker, L. A. *et al.* Real-world data confirm the effectiveness of caplacizumab in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv* **4**, 3085–3092 (2020).

119. Coppo, P. *et al.* A regimen with caplacizumab, immunosuppression, and plasma exchange prevents unfavorable outcomes in immune-mediated TTP. *Blood* **137**, 733–742 (2021).

120. Prasannan, N. *et al.* Delayed normalization of ADAMTS13 activity in acute thrombotic thrombocytopenic purpura in the caplacizumab era. *Blood* **141**, 2206–2213 (2023).

121. Völker, L. A. *et al.* Treatment of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura without plasma exchange in selected patients under caplacizumab. *J Thromb Haemost* **18**, 3061–3066 (2020).

122. Balduini, C. L. *et al.* High versus standard dose methylprednisolone in the acute phase of idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a randomized study. *Ann. Hematol.* **89**, 591–596 (2010).

123. Benhamou, Y., Sauvètre, G., Grangé, S., Veyradier, A. & Coppo, P. [Venous thrombo-embolism during immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura is prevalent in patients with a prolonged treatment with therapeutic plasma exchange]. *Rev Med Interne* **41**, 809–813 (2020).

124. Scully, M. *et al.* Recombinant ADAMTS-13: first-in-human pharmacokinetics and safety in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **130**, 2055–2063 (2017).

125. Ercig, B. *et al.* N-glycan-mediated shielding of ADAMTS13 prevents binding of pathogenic autoantibodies in immune-mediated TTP. *Blood* **137**, 2694–2698 (2021).

126. Postmus, T. *et al.* Impact of N-glycan mediated shielding of ADAMTS-13 on the binding of pathogenic antibodies in immune thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* (2023) doi:10.1016/j.jtha.2023.08.017.

127. van den Berg, J. *et al.* Daratumumab for immune thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv* **6**, 993–997 (2022).

128. Patriquin, C. J. *et al.* Bortezomib in the treatment of refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **173**, 779–785 (2016).

129. Hie, M. *et al.* Preemptive rituximab infusions after remission efficiently prevent relapses in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **124**, 204–210 (2014).

130. Barba, C. *et al.* Intensive rituximab regimen in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura can circumvent unresponsiveness to standard rituximab treatment. *British Journal of Haematology* **192**, e21–e25 (2021).

131. B, H. *et al.* Depression and cognitive impairment following recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. *American journal of hematology* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25975932/ (2015) doi:10.1002/ajh.24060.

132. Chaturvedi, S. *et al.* Silent cerebral infarction during immune TTP remission: prevalence, predictors, and impact on cognition. *Blood* **142**, 325–335 (2023).

133. Upreti, H. *et al.* Reduced ADAMTS13 activity during TTP remission is associated with stroke in TTP survivors. *Blood* **134**, 1037–1045 (2019).

134. Lewis, Q. F. *et al.* Long-term deficits in health-related quality of life after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion* **49**, 118–124 (2009).

135. T, F., Kj, A. & I, S. Long term outcome and sequelae in patients after acute thrombotic thrombocytopenic purpura episodes. *Hamostaseologie* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23599034/ (2013) doi:10.5482/HAMO-12-11-0019.

136. Nachman, R. L. & Jaffe, E. A. Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *J Clin Invest* **114**, 1037–1040 (2004).

137. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* **100**, 158–173 (2007).

138. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res.* **100**, 174–190 (2007).

139. Sturtzel, C. Endothelial Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1003**, 71–91 (2017).

140. Jourde-Chiche, N. *et al.* Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nat Rev Nephrol* **15**, 87–108 (2019).

141. Weninger, W. *et al.* Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. *Immunity* **12**, 665–676 (2000).

142. Sabatier, F., Camoin-Jau, L., Anfosso, F., Sampol, J. & Dignat-George, F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 454–471 (2009).

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

144. Pober, J. S. & Sessa, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 803–815 (2007).

145. Pober, J. S. & Cotran, R. S. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* **50**, 537–544 (1990).

146. Mourik, M. & Eikenboom, J. Lifecycle of Weibel-Palade bodies. *Hamostaseologie* **37**, 13–24 (2017).

147. Ms, G., D, P. & Mc, K. Weibel-Palade bodies--sentinels of acute stress. *Nature reviews. Nephrology* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19556996/ (2009) doi:10.1038/nrneph.2009.87.

148. Lowenstein, C. J., Morrell, C. N. & Yamakuchi, M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**, 302–308 (2005).

149. Rondaij, M. G., Bierings, R., Kragt, A., van Mourik, J. A. & Voorberg, J. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1002–1007 (2006).

150. Tiruppathi, C., Minshall, R. D., Paria, B. C., Vogel, S. M. & Malik, A. B. Role of Ca2+ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul. Pharmacol.* **39**, 173–185 (2002).

151. Lorenzi, O. *et al.* Protein kinase C-delta mediates von Willebrand factor secretion from endothelial cells in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) but not histamine. *J Thromb Haemost* **6**, 1962–1969 (2008).

152. Poredos, P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int Angiol* **21**, 109–116 (2002).

153. Ludmer, P. L. *et al.* Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* **315**, 1046–1051 (1986).

154. Endemann, D. H. & Schiffrin, E. L. Endothelial dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1983–1992 (2004).

155. Huynh, D. T. N. & Heo, K.-S. Therapeutic targets for endothelial dysfunction in vascular diseases. *Arch. Pharm. Res.* (2019) doi:10.1007/s12272-019-01180-7.

156. Lekakis, J. *et al.* Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **18**, 775–789 (2011).

157. Horstman, L. L., Jy, W., Jimenez, J. J. & Ahn, Y. S. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front. Biosci.* **9**, 1118–1135 (2004).

158. Thijssen, D. H. J. *et al.* Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H2–H12 (2011).

159. T, K. *et al.* Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15054046/ (2004) doi:10.1182/blood-2004-02-0518.

160. Ae, B. & Vl, W. Vascular biology: cellular and molecular profiling. *Seminars in neurology* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16479445/ (2006) doi:10.1055/s-2006-933310.

161. Tp, P., Br, S., Pt, S. & Rk, J. Conventional and high-speed intravital multiphoton laser scanning microscopy of microvasculature, lymphatics, and leukocyte-endothelial interactions. *Molecular imaging* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12920856/ (2002) doi:10.1162/15353500200200004.

162. Teuwen, L.-A., Geldhof, V., Pasut, A. & Carmeliet, P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat Rev Immunol* **20**, 389–391 (2020).

163. McDonald, D. M. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, S39-45 (2001).

164. Nagy, J. A., Benjamin, L., Zeng, H., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* **11**, 109–119 (2008).

165. Abrahamov, D. *et al.* Blood–Brain Barrier Disruption After Cardiopulmonary Bypass: Diagnosis and Correlation to Cognition. *The Annals of Thoracic Surgery* **104**, 161–169 (2017).

166. Weis, S. M. & Cheresh, D. A. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* **437**, 497–504 (2005).

167. Gamble, J. R. *et al.* Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res* **87**, 603–607 (2000).

168. Garcia, J. G. *et al.* Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest* **108**, 689–701 (2001).

169. Moy, A. B., Bodmer, J. E., Blackwell, K., Shasby, S. & Shasby, D. M. cAMP protects endothelial barrier function independent of inhibiting MLC20-dependent tension development. *Am J Physiol* **274**, L1024-1029 (1998).

170. Takahashi, M., Ishida, T., Traub, O., Corson, M. A. & Berk, B. C. Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. *J Vasc Res* **34**, 212–219 (1997).

171. Kevil, C. G. *et al.* Expression of Zonula Occludens and Adherens Junctional Proteins in Human Venous and Arterial Endothelian Cells: Role of Occludin in Endothelial Solute Barriers. *Microcirculation* **5**, 197–210 (1998).

172. Obermeier, B., Daneman, R. & Ransohoff, R. M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* **19**, 1584–1596 (2013).

173. M, T. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3048970/ (1988) doi:10.1242/dev.102.4.639.

174. C, G. *et al.* Overlapping and divergent signaling pathways of N-cadherin and VE-cadherin in endothelial cells. *Blood* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22246030/ (2012) doi:10.1182/blood-2011-09-381012.

175. Corada, M. *et al.* Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9815–9820 (1999).

176. D, V. *et al.* Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8896407/ (1996).

177. Chervin-Pétinot, A. *et al.* Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) interacts with α-catenin and actin filaments in endothelial cells and stabilizes vascular capillary network in vitro. *J Biol Chem* **287**, 7556–7572 (2012).

178. Noda, K. *et al.* Vascular endothelial-cadherin stabilizes at cell-cell junctions by anchoring to circumferential actin bundles through alpha- and beta-catenins in cyclic AMP-Epac-Rap1 signal-activated endothelial cells. *Mol Biol Cell* **21**, 584–596 (2010).

179. Filewod, N. C. & Lee, W. L. Inflammation without Vascular Leakage. Science Fiction No Longer? *Am J Respir Crit Care Med* **200**, 1472–1476 (2019).

180. Vestweber, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol* **15**, 692–704 (2015).

181. Wessel, F. *et al.* Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol* **15**, 223–230 (2014).

182. B, M. *et al.* Ubiquitous expression of the calcitonin-i gene in multiple tissues in response to sepsis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11232031/ (2001) doi:10.1210/jcem.86.1.7089.

183. Rho, S.-S., Ando, K. & Fukuhara, S. Dynamic Regulation of Vascular Permeability by Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Endothelial Cell-Cell Junctions. *J Nippon Med Sch* **84**, 148–159 (2017).

184. Nottebaum, A. F. *et al.* VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med* **205**, 2929–2945 (2008).

185. Wojciak-Stothard, B. & Ridley, A. J. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology* **39**, 187–199 (2002).

186. van Nieuw Amerongen, G. P., van Delft, S., Vermeer, M. A., Collard, J. G. & van Hinsbergh, V. W. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res* **87**, 335–340 (2000).

187. Cm, M. *et al.* RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock. *Nature communications* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25857352/ (2015) doi:10.1038/ncomms7725.

188. Kem, H., L, B. & Nm, W. Regulation and Dysregulation of Endothelial Permeability during Systemic Inflammation. *Cells* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35741064/ (2022) doi:10.3390/cells11121935.

189. David, S. *et al.* Angiopoietin-2 may contribute to multiple organ dysfunction and death in sepsis*. *Crit Care Med* **40**, 3034–3041 (2012).

190. Fiedler, U. *et al.* The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* **103**, 4150–4156 (2004).

191. Boggild, A. K. *et al.* Use of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as adjunctive treatment for Plasmodium falciparum malaria: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* **49**, 841–849 (2009).

192. Serghides, L. *et al.* PPARγ agonists improve survival and neurocognitive outcomes in experimental cerebral malaria and induce neuroprotective pathways in human malaria. *PLoS Pathog* **10**, e1003980 (2014).

193. Campochiaro, C. *et al.* Efficacy and safety of tocilizumab in severe COVID-19 patients: a single-centre retrospective cohort study. *Eur. J. Intern. Med.* **76**, 43–49 (2020).

194. Han, S. *et al.* Amelioration of sepsis by TIE2 activation–induced vascular protection. *Science Translational Medicine* (2016) doi:10.1126/scitranslmed.aad9260.

195. Page, E. E., Kremer Hovinga, J. A., Terrell, D. R., Vesely, S. K. & George, J. N. Clinical importance of ADAMTS13 activity during remission in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **128**, 2175–2178 (2016).

196. George, J. N. Measuring ADAMTS13 activity in patients with suspected thrombotic thrombocytopenic purpura: when, how, and why? *Transfusion* **55**, 11–13 (2015).

197. Takahashi, H. *et al.* Circulating thrombomodulin in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Hematol.* **38**, 174–177 (1991).

198. Zeigler, Z. R. *et al.* Plasma von Willebrand Factor Antigen (vWF:AG) and thrombomodulin (TM) levels in Adult Thrombotic Thrombocytopenic Purpura/Hemolytic Uremic Syndromes (TTP/HUS) and bone marrow transplant-associated thrombotic microangiopathy (BMT-TM). *Am. J. Hematol.* **53**, 213–220 (1996).

199. Wada, H. *et al.* Poor outcome in disseminated intravascular coagulation or thrombotic thrombocytopenic purpura patients with severe vascular endothelial cell injuries. *Am. J. Hematol.* **58**, 189–194 (1998).

200. Mori, Y. *et al.* Increased plasma thrombomodulin as a vascular endothelial cell marker in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **7**, 5–9 (2001).

201. Chong, B. H. *et al.* Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. *Blood* **83**, 1535–1541 (1994).

202. Katayama, M. *et al.* Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome. *Br. J. Haematol.* **84**, 702–710 (1993).

203. Wada, H. *et al.* Increased levels of vascular endothelial cell markers in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Hematol.* **44**, 101–105 (1993).

204. Widemann, A. *et al.* Circulating endothelial cells and progenitors as prognostic factors during autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura: results of a prospective multicenter French study. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 1601–1609 (2014).

205. Lu, R., Sui, J. & Zheng, X. L. Elevated plasma levels of syndecan-1 and soluble thrombomodulin predict adverse outcomes in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv* **4**, 5378–5388 (2020).

206. Kobayashi, M. *et al.* Decreased plasma tissue factor pathway inhibitor levels in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Haemost.* **73**, 10–14 (1995).

207. Glas-Greenwalt, P. *et al.* Fibrinolysis in health and disease: abnormal levels of plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, and protein C in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Lab. Clin. Med.* **108**, 415–422 (1986).

208. Tersteeg, C. *et al.* Plasmin cleavage of von Willebrand factor as an emergency bypass for ADAMTS13 deficiency in thrombotic microangiopathy. *Circulation* **129**, 1320–1331 (2014).

209. Lian, E. C.-Y. Pathogenesis of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: ADAMTS13 Deficiency and Beyond. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **31**, 625–632 (2005).

210. van Mourik, J. A., Boertjes, R., Huisveld, I. A., Fijnvandraat, K. & Pajkrt, D. von Willebrand Factor Propeptide in Vascular Disorders: A Tool to Distinguish Between Acute and Chronic Endothelial Cell Perturbation. 8.

211. Romani de Wit, T. *et al.* Endothelial cell activation in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): a prospective analysis. *British Journal of Haematology* **123**, 522–527 (2003).

212. Béranger, N. *et al.* Loss of von Willebrand factor high-molecular-weight multimers at acute phase is associated with detectable anti-ADAMTS13 IgG and neurological symptoms in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Res.* **181**, 29–35 (2019).

213. Lu, R. & Zheng, X. L. Plasma Levels of Big Endothelin-1 Are Associated with Renal Insufficiency and In-Hospital Mortality of Immune Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Thromb Haemost* **122**, 344–352 (2022).

214. Jimenez, J. J., Jy, W., Mauro, L. M., Horstman, L. L. & Ahn, Y. S. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br. J. Haematol.* **112**, 81–90 (2001).

215. Jimenez, J. J. *et al.* Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br. J. Haematol.* **123**, 896–902 (2003).

216. Lefevre, P., George, F., Durand, J. M. & Sampol, J. Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Haemost.* **69**, 522 (1993).

217. Erdbruegger, U., Woywodt, A., Kirsch, T., Haller, H. & Haubitz, M. Circulating endothelial cells as a prognostic marker in thrombotic microangiopathy. *Am. J. Kidney Dis.* **48**, 564–570 (2006).

218. Dang, C. T., Magid, M. S., Weksler, B., Chadburn, A. & Laurence, J. Enhanced Endothelial Cell Apoptosis in Splenic Tissues of Patients With Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. 8.

219. Jimenez, J. J. *et al.* Response to Laurence. *British Journal of Haematology* **125**, 416–417 (2004).

220. Burns, E. R. & Zucker-Franklin, D. Pathologic effects of plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura on platelets and cultured vascular endothelial cells. *Blood* **60**, 1030–1037 (1982).

221. Plasma from patients with idiopathic and human immunodeficiency Virus-Associated thrombotic thrombocytopenic purpura induces apoptosis in microvascular endothelial cells. *Transfusion Medicine Reviews* **10**, 315 (1996).

222. Tandon, N. N., Rock, G. & Jamieson, G. A. Anti-CD36 antibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **88**, 816–825 (1994).

223. Schultz, D. R. *et al.* Anti-CD36 autoantibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic disorders: identification of an 85 kD form of CD36 as a target antigen. *Br. J. Haematol.* **103**, 849–857 (1998).

224. Mitra, D. *et al.* Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Sporadic Hemolytic-Uremic Syndrome Plasmas Induce Apoptosis in Restricted Lineages of Human Microvascular Endothelial Cells. 12.

225. Mitra, D., Kim, J., MacLow, C., Karsan, A. & Laurence, J. Role of caspases 1 and 3 and Bcl-2-related molecules in endothelial cell apoptosis associated with thrombotic microangiopathies. *American Journal of Hematology* **59**, 279–287 (1998).

226. Jimenez, J. J. *et al.* Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thrombosis Research* **109**, 175–180 (2003).

227. Jy, W. *et al.* Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation: EMP-platelet interaction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**, 1301–1308 (2005).

228. Laurence, J. Endothelial cell activation and apoptosis in the thrombotic microangiopathies. *British Journal of Haematology* **125**, 415–416 (2004).

229. Tellier, E. *et al.* Immune thrombotic thrombocytopenic purpura plasmas induce calcium- and IgG-dependent endothelial activation: correlations with disease severity. *Haematologica* (2022) doi:10.3324/haematol.2022.280651.

230. Motto, D. G. *et al.* Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **115**, 2752–2761 (2005).

231. Banno, F. *et al.* Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **107**, 3161–3166 (2006).

232. Huang, J., Motto, D. G., Bundle, D. R. & Sadler, J. E. Shiga toxin B subunits induce VWF secretion by human endothelial cells and thrombotic microangiopathy in ADAMTS13-deficient mice. *Blood* **116**, 3653–3659 (2010).

233. Chauhan, A. K. *et al.* The combined roles of ADAMTS13 and VWF in murine models of TTP, endotoxemia, and thrombosis. *Blood* **111**, 3452–3457 (2008).

234. Schiviz, A. *et al.* A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood* **119**, 6128–6135 (2012).

235. Tersteeg, C. *et al.* Potential for Recombinant ADAMTS13 as an Effective Therapy for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 2336–2342 (2015).

236. Pickens, B. *et al.* Platelet-delivered ADAMTS13 inhibits arterial thrombosis and prevents thrombotic thrombocytopenic purpura in murine models. *Blood* **125**, 3326–3334 (2015).

237. Deforche, L. *et al.* Generation of Anti-Murine ADAMTS13 Antibodies and Their Application in a Mouse Model for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *PLOS ONE* **11**, e0160388 (2016).

238. Le Besnerais, M. *et al.* Assessment of endothelial damage and cardiac injury in a mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **14**, 1917–1930 (2016).

239. Feys, H. B. *et al.* Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (Papio ursinus). *Blood* **116**, 2005–2010 (2010).

240. Zheng, L. *et al.* Histone-induced thrombotic thrombocytopenic purpura in adamts13-/- zebrafish depends on von Willebrand factor. *Haematologica* (2019) doi:10.3324/haematol.2019.237396.

241. Michels, A. *et al.* Histones link inflammation and thrombosis through the induction of Weibel-Palade body exocytosis. *J Thromb Haemost* **14**, 2274–2286 (2016).

242. Fujimura, Y. *et al.* Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br. J. Haematol.* **144**, 742–754 (2009).

243. Falter, T. *et al.* Late onset and pregnancy-induced congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hamostaseologie* **34**, 244–248 (2014).

244. Stirling, Y., Woolf, L., North, W. R., Seghatchian, M. J. & Meade, T. W. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb. Haemost.* **52**, 176–182 (1984).

245. Furlan, M. *et al.* von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1578–1584 (1998).

246. George, J. N. The association of pregnancy with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Curr. Opin. Hematol.* **10**, 339–344 (2003).

247. Morioka, M. *et al.* A first bout of thrombotic thrombocytopenic purpura triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nulliparous female with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood Transfus* **12 Suppl 1**, s153-155 (2014).

248. Bitzan, M. & Zieg, J. Influenza-associated thrombotic microangiopathies. *Pediatr Nephrol* **33**, 2009–2025 (2018).

249. Morgand, M. *et al.* High prevalence of infectious events in thrombotic thrombocytopenic purpura and genetic relationship with toll-like receptor 9 polymorphisms: experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Transfusion* **54**, 389–397 (2014).

250. Kavanagh, D. *et al.* Type I interferon causes thrombotic microangiopathy by a dose-dependent toxic effect on the microvasculature. *Blood* **128**, 2824–2833 (2016).

251. Gangaraju, R., Kim, S. J., Dong, J.-F., Swierczek, S. & Prchal, J. T. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Associated With Pegylated Interferon Alfa-2a Use in a Patient With Polycythemia Vera. *J Natl Compr Canc Netw* **15**, 757–760 (2017).

252. Jia, H. *et al.* Endothelial cell functions impaired by interferon in vitro: Insights into the molecular mechanism of thrombotic microangiopathy associated with interferon therapy. *Thromb. Res.* **163**, 105–116 (2018).

253. Bernardo, A., Ball, C., Nolasco, L., Moake, J. F. & Dong, J. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* **104**, 100–106 (2004).

254. Cao, W., Niiya, M., Zheng, X., Shang, D. & Zheng, X. L. Inflammatory Cytokines Inhibit ADAMTS13 Synthesis in Hepatic Stellate Cells and Endothelial Cells. *J Thromb Haemost* **6**, 1233–1235 (2008).

255. Pillai, V. G. *et al.* Human neutrophil peptides inhibit cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13: a potential link of inflammation to TTP. *Blood* **128**, 110–119 (2016).

256. Chen, J. *et al.* Oxidative modification of von Willebrand factor by neutrophil oxidants inhibits its cleavage by ADAMTS13. *Blood* **115**, 706–712 (2010).

257. Wang, Y. *et al.* Hypochlorous acid generated by neutrophils inactivates ADAMTS13: an oxidative mechanism for regulating ADAMTS13 proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem* **290**, 1422–1431 (2015).

258. Miyata, T. & Fan, X. A second hit for TMA. *Blood* **120**, 1152–1154 (2012).

259. del Arco, A. *et al.* Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with human immunodeficiency virus infection: demonstration of p24 antigen in endothelial cells. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 360–363 (1993).

260. Tehrani, H. A., Darnahal, M., Vaezi, M. & Haghighi, S. COVID-19 associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) ; A case series and mini-review. *Int Immunopharmacol* **93**, 107397 (2021).

261. M, M. V., A, A. R. & Ž, V.-H. Coronavirus Disease 2019-Associated Thrombotic Microangiopathy: Literature Review. *International journal of molecular sciences* **23**, (2022).

262. A, R. *et al.* Endotheliopathy Is Induced by Plasma From Critically Ill Patients and Associated With Organ Failure in Severe COVID-19. *Circulation* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32970476/ (2020) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050907.

263. El Sissy, C. *et al.* COVID-19 as a potential trigger of complement-mediated atypical HUS. *Blood* **138**, 1777–1782 (2021).

264. Capecchi, M. *et al.* Risk of relapse after SARS-CoV-2 vaccine in the Milan cohort of thrombotic thrombocytopenic purpura patients. *Haematologica* (2023) doi:10.3324/haematol.2022.282478.

265. Zakarija, A. *et al.* Ticlopidine- and clopidogrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): review of clinical, laboratory, epidemiological, and pharmacovigilance findings (1989-2008). *Kidney Int. Suppl.* S20-24 (2009) doi:10.1038/ki.2008.613.

266. Mauro, M., Zlatopolskiy, A., Raife, T. J. & Laurence, J. Thienopyridine-linked thrombotic microangiopathy: association with endothelial cell apoptosis and activation of MAP kinase signalling cascades. *Br. J. Haematol.* **124**, 200–210 (2004).

267. Praprotnik, S. *et al.* Anti-endothelial cell antibodies from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura specifically activate small vessel endothelial cells. *Int. Immunol.* **13**, 203–210 (2001).

268. Wright, J. F. *et al.* Characterization of platelet glycoproteins and platelet/endothelial cell antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **107**, 546–555 (1999).

269. Raife, T. J., Atkinson, B., Aster, R. H., McFarland, J. G. & Gottschall, J. L. Minimal evidence of platelet and endothelial cell reactive antibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Hematol.* **62**, 82–87 (1999).

270. Drachenberg, C. B. & Papadimitriou, J. C. Endothelial injury in renal antibody-mediated allograft rejection: a schematic view based on pathogenesis. *Transplantation* **95**, 1073–1083 (2013).

271. Ren, G. *et al.* A complement-dependent model of thrombotic thrombocytopenic purpura induced by antibodies reactive with endothelial cells. *Clin. Immunol.* **103**, 43–53 (2002).

272. Namal Rathnayaka, R., Ranathunga, P. A. N. & Kularatne, S. A. Thrombotic Microangiopathy, Hemolytic Uremic Syndrome, and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Following Hump-nosed Pit Viper (Genus: Hypnale) Envenoming in Sri Lanka. *Wilderness Environ Med* **30**, 66–78 (2019).

273. Tan, C. H., Tan, N. H., Sim, S. M., Fung, S. Y. & Gnanathasan, C. A. Proteomic investigation of Sri Lankan hump-nosed pit viper (Hypnale hypnale) venom. *Toxicon* **93**, 164–170 (2015).

274. Vanuopadath, M. *et al.* Mass spectrometry-assisted venom profiling of Hypnale hypnale found in the Western Ghats of India incorporating de novo sequencing approaches. *Int. J. Biol. Macromol.* **118**, 1736–1746 (2018).

275. Isbister, G. K. *et al.* Thrombotic microangiopathy from Australian brown snake (Pseudonaja) envenoming. *Intern Med J* **37**, 523–528 (2007).

276. Naqvi, T. A., Baumann, M. A. & Chang, J. C. Post-operative thrombotic thrombocytopenic purpura: a review. *Int J Clin Pract* **58**, 169–172 (2004).

277. Noris, M. & Remuzzi, G. Overview of complement activation and regulation. *Semin. Nephrol.* **33**, 479–492 (2013).

278. Noris, M., Mescia, F. & Remuzzi, G. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat Rev Nephrol* **8**, 622–633 (2012).

279. Mannes, M. *et al.* Complement inhibition at the level of C3 or C5: mechanistic reasons for ongoing terminal pathway activity. *Blood* **137**, 443–455 (2021).

280. Schmidt, C. Q., Schrezenmeier, H. & Kavanagh, D. Complement and the prothrombotic state. *Blood* **139**, 1954–1972 (2022).

281. Fakhouri, F., Zuber, J., Frémeaux-Bacchi, V. & Loirat, C. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **390**, 681–696 (2017).

282. Roumenina, L. T. *et al.* A prevalent C3 mutation in aHUS patients causes a direct C3 convertase gain of function. *Blood* **119**, 4182–4191 (2012).

283. Frémeaux-Bacchi, V. *et al.* Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* **112**, 4948–4952 (2008).

284. Brocklebank, V. *et al.* Atypical hemolytic uremic syndrome in the era of terminal complement inhibition: an observational cohort study. *Blood* **142**, 1371–1386 (2023).

285. Amoura, Z. *et al.* French National Diagnostic and Care Protocol for antiphospholipid syndrome in adults and children. *Rev Med Interne* **44**, 495–520 (2023).

286. Austin, S. K. *et al.* The VWF/ADAMTS13 axis in the antiphospholipid syndrome: ADAMTS13 antibodies and ADAMTS13 dysfunction. *Br J Haematol* **141**, 536–544 (2008).

287. Seshan, S. V. *et al.* Role of tissue factor in a mouse model of thrombotic microangiopathy induced by antiphospholipid antibodies. *Blood* **114**, 1675–1683 (2009).

288. Zhang, J. & McCrae, K. R. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood* **105**, 1964–1969 (2005).

289. Chaturvedi, S. *et al.* Complement activity and complement regulatory gene mutations are associated with thrombosis in APS and CAPS. *Blood* **135**, 239–251 (2020).

290. Shapira, I., Andrade, D., Allen, S. L. & Salmon, J. E. Brief report: induction of sustained remission in recurrent catastrophic antiphospholipid syndrome via inhibition of terminal complement with eculizumab. *Arthritis Rheum* **64**, 2719–2723 (2012).

291. Stratton, R. J. *et al.* Different patterns of endothelial cell activation in renal and pulmonary vascular disease in scleroderma. *QJM* **91**, 561–566 (1998).

292. Esposito, J. *et al.* The association of low complement with disease activity in systemic sclerosis: a prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* **18**, 246 (2016).

293. Okrój, M., Johansson, M., Saxne, T., Blom, A. M. & Hesselstrand, R. Analysis of complement biomarkers in systemic sclerosis indicates a distinct pattern in scleroderma renal crisis. *Arthritis Res Ther* **18**, 267 (2016).

294. Farrukh, L., Steen, V. D., Shapiro, L. & Mehta, S. Studying the Role of C5-Inhibition Therapy in Scleroderma Renal Crisis-Induced Thrombotic Microangiopathy - A Review of Literature. *Semin Arthritis Rheum* **63**, 152256 (2023).

295. Orth, D. *et al.* Shiga toxin activates complement and binds factor H: evidence for an active role of complement in hemolytic uremic syndrome. *J. Immunol.* **182**, 6394–6400 (2009).

296. Brady, T. M. *et al.* Typical Hus: Evidence of Acute Phase Complement Activation from a Daycare Outbreak. *J Clin Exp Nephrol* **1**, (2016).

297. Burwick, R. M., Fichorova, R. N., Dawood, H. Y., Yamamoto, H. S. & Feinberg, B. B. Urinary excretion of C5b-9 in severe preeclampsia: tipping the balance of complement activation in pregnancy. *Hypertension* **62**, 1040–1045 (2013).

298. Westwood, J.-P., Langley, K., Heelas, E., Machin, S. J. & Scully, M. Complement and cytokine response in acute Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Br. J. Haematol.* **164**, 858–866 (2014).

299. Bettoni, S. *et al.* Interaction between Multimeric von Willebrand Factor and Complement: A Fresh Look to the Pathophysiology of Microvascular Thrombosis. *J. Immunol.* **199**, 1021–1040 (2017).

300. Staley, E. M. *et al.* Clinical factors and biomarkers predict outcome in patients with immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *1* **104**, 166–175 (2019).

301. Wu, T. C. *et al.* Complement activation and mortality during an acute episode of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 1925–1927 (2013).

302. Cataland, S. R., Holers, V. M., Geyer, S., Yang, S. & Wu, H. M. Biomarkers of terminal complement activation confirm the diagnosis of aHUS and differentiate aHUS from TTP. *Blood* **123**, 3733–3738 (2014).

303. Tati, R. *et al.* Complement activation associated with ADAMTS13 deficiency in human and murine thrombotic microangiopathy. *J. Immunol.* **191**, 2184–2193 (2013).

304. Mikes, B. *et al.* Carboxiterminal pro-endothelin-1 as an endothelial cell biomarker in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Haemost.* **115**, 1034–1043 (2016).

305. Turner, N., Sartain, S. & Moake, J. Ultralarge von Willebrand factor-induced platelet clumping and activation of the alternative complement pathway in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndromes. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **29**, 509–524 (2015).

306. Feng, S., Liang, X., Kroll, M. H., Chung, D. W. & Afshar-Kharghan, V. von Willebrand factor is a cofactor in complement regulation. *Blood* **125**, 1034–1037 (2015).

307. Zheng, L., Zhang, D., Cao, W., Song, W. & Zheng, X. L. Synergistic effects of ADAMTS13 deficiency and complement activation in pathogenesis of thrombotic microangiopathy. *Blood* (2019) doi:10.1182/blood.2019001040.

308. Foreman, K. E. *et al.* C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **94**, 1147–1155 (1994).

309. Crawley, J. T. B. *et al.* Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood* **105**, 1085–1093 (2005).

310. Roumenina, L. T., Rayes, J., Frimat, M. & Fremeaux-Bacchi, V. Endothelial cells: source, barrier, and target of defensive mediators. *Immunol. Rev.* **274**, 307–329 (2016).

311. Lorant, D. E. *et al.* Inflammatory roles of P-selectin. *J. Clin. Invest.* **92**, 559–570 (1993).

312. Morigi, M. *et al.* Alternative pathway activation of complement by Shiga toxin promotes exuberant C3a formation that triggers microvascular thrombosis. *J. Immunol.* **187**, 172–180 (2011).

313. Tedesco, F. *et al.* The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J. Exp. Med.* **185**, 1619–1627 (1997).

314. Ruiz-Torres, M. P. *et al.* Complement activation: the missing link between ADAMTS-13 deficiency and microvascular thrombosis of thrombotic microangiopathies. *Thromb. Haemost.* **93**, 443–452 (2005).

315. del Conde, I., Crúz, M. A., Zhang, H., López, J. A. & Afshar-Kharghan, V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *The Journal of Experimental Medicine* **201**, 871–879 (2005).

316. Chapin, J., Weksler, B., Magro, C. & Laurence, J. Eculizumab in the treatment of refractory idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **157**, 772–774 (2012).

317. Tsai, E., Chapin, J., Laurence, J. C. & Tsai, H.-M. Use of eculizumab in the treatment of a case of refractory, ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura: additional data and clinical follow-up. *Br. J. Haematol.* **162**, 558–559 (2013).

318. Pecoraro, C. *et al.* Treatment of Congenital Thrombotic Thrombocytopenic Purpura With Eculizumab. *Am. J. Kidney Dis.* **66**, 1067–1070 (2015).

319. Vigna, E. *et al.* Efficacy of eculizumab in severe ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) refractory to standard therapies. *Transfus. Apher. Sci.* **57**, 247–249 (2018).

320. Rother, R. P., Bell, L., Hillmen, P. & Gladwin, M. T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* **293**, 1653–1662 (2005).

321. Vinchi, F. *et al.* Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. *Circulation* **127**, 1317–1329 (2013).

322. Matsushita, K. *et al.* Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell* **115**, 139–150 (2003).

323. Studt, J.-D. *et al.* Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood* **105**, 542–544 (2005).

324. May, O. *et al.* Heme Drives Susceptibility of Glomerular Endothelium to Complement Overactivation Due to Inefficient Upregulation of Heme Oxygenase-1. *Front Immunol* **9**, 3008 (2018).

325. Frimat, M. *et al.* Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* **122**, 282–292 (2013).

326. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).

327. Fuchs, T. A. *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 15880–15885 (2010).

328. Fuchs, T. A., Bhandari, A. A. & Wagner, D. D. Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. *Blood* **118**, 3708–3714 (2011).

329. Fuchs, T. A., Kremer Hovinga, J. A., Schatzberg, D., Wagner, D. D. & Lämmle, B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood* **120**, 1157–1164 (2012).

330. Ramos, M. V. *et al.* Induction of Neutrophil Extracellular Traps in Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *J Innate Immun* **8**, 400–411 (2016).

331. Coppo, P. & Centre de référence des microangiopathies thrombotiques (CNR-MAT). [Secondary thrombotic microangiopathies]. *Rev Med Interne* **38**, 731–736 (2017).

332. Jodele, S. *et al.* A new paradigm: Diagnosis and management of HSCT-associated thrombotic microangiopathy as multi-system endothelial injury. *Blood Reviews* **29**, 191–204 (2015).

333. Goldberg, R. J., Nakagawa, T., Johnson, R. J. & Thurman, J. M. The role of endothelial cell injury in thrombotic microangiopathy. *Am. J. Kidney Dis.* **56**, 1168–1174 (2010).

334. Ha, E. & Mun, K. C. Effects of cyclosporine on metalloproteinase in endothelial cells. *Transplant. Proc.* **44**, 991–992 (2012).

335. Jodele, S. *et al.* The genetic fingerprint of susceptibility for transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Blood* **127**, 989–996 (2016).

336. Jodele, S. Complement in Pathophysiology and Treatment of Transplant-Associated Thrombotic Microangiopathies. *Seminars in Hematology* **55**, 159–166 (2018).

337. Jodele, S. *et al.* Abnormalities in the alternative pathway of complement in children with hematopoietic stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Blood* **122**, 2003–2007 (2013).

338. Wanchoo, R., Bayer, R. L., Bassil, C. & Jhaveri, K. D. Emerging Concepts in Hematopoietic Stem Cell Transplantation–Associated Renal Thrombotic Microangiopathy and Prospects for New Treatments. *American Journal of Kidney Diseases* **72**, 857–865 (2018).

339. Biedermann, B. C. *et al.* Endothelial injury mediated by cytotoxic T lymphocytes and loss of microvessels in chronic graft versus host disease. *Lancet* **359**, 2078–2083 (2002).

340. Vander Lugt, M. T. *et al.* ST2 as a marker for risk of therapy-resistant graft-versus-host disease and death. *N. Engl. J. Med.* **369**, 529–539 (2013).

341. Luft, T. *et al.* Steroid-refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system. *Blood* **118**, 1685–1692 (2011).

342. Gloude, N. J. *et al.* Circulating dsDNA, endothelial injury, and complement activation in thrombotic microangiopathy and GVHD. *Blood* **130**, 1259–1266 (2017).

343. Yuen, J. *et al.* NETosing Neutrophils Activate Complement Both on Their Own NETs and Bacteria via Alternative and Non-alternative Pathways. *Front Immunol* **7**, (2016).

344. López, J. A. & Dong, J. Cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS-13 on endothelial cells. *Seminars in Hematology* **41**, 15–23 (2004).

345. Padilla, A. *et al.* P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood* **103**, 2150–2156 (2004).

346. Huang, S.-H. S. *et al.* Blood-brain barrier permeability in survivors of immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura: a pilot study. *Blood Adv* **5**, 4211–4218 (2021).

347. Nation, D. A. *et al.* Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med* **25**, 270–276 (2019).

348. Robey, F. A. *et al.* Proteolysis of human C-reactive protein produces peptides with potent immunomodulating activity. *J. Biol. Chem.* **262**, 7053–7057 (1987).

349. Bertuglia, S. *et al.* ITF1697, a stable Lys-Pro-containing peptide, inhibits weibel-palade body exocytosis induced by ischemia/reperfusion and pressure elevation. *Mol. Med.* **13**, 615–624 (2007).

350. Fiedel, B. A. Influence of tuftsin-like synthetic peptides derived from C-reactive protein (CRP) on platelet behaviour. *Immunology* **64**, 487–493 (1988).

351. Yasuda, K. *et al.* Functional consequences of inhibiting exocytosis of Weibel-Palade bodies in acute renal ischemia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **302**, F713-721 (2012).

352. Dirksen, M. T. *et al.* The effect of ITF-1697 on reperfusion in patients undergoing primary angioplasty. Safety and efficacy of a novel tetrapeptide, ITF-1697. *Eur. Heart J.* **25**, 392–400 (2004).

353. Boutin, H. *et al.* Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J Neurosci* **21**, 5528–5534 (2001).

354. Courties, G., Moskowitz, M. A. & Nahrendorf, M. The innate immune system after ischemic injury: lessons to be learned from the heart and brain. *JAMA Neurol* **71**, 233–236 (2014).

355. Abbate, A. *et al.* Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circ Res* **126**, 1260–1280 (2020).

356. Vilahur, G. & Badimon, L. Ischemia/reperfusion activates myocardial innate immune response: the key role of the toll-like receptor. *Frontiers in Physiology* **5**, (2014).

357. Zhang, X. *et al.* The protective effect of Luteolin on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury through TLR4/NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway. *Biomed Pharmacother* **91**, 1042–1052 (2017).

358. Mersmann, J. *et al.* Left ventricular dilation in toll-like receptor 2 deficient mice after myocardial ischemia/reperfusion through defective scar formation. *Basic Res Cardiol* **106**, 89–98 (2011).

359. Liu, F., Huang, J. & Sadler, J. E. Shiga toxin (Stx)1B and Stx2B induce von Willebrand factor secretion from human umbilical vein endothelial cells through different signaling pathways. *Blood* **118**, 3392–3398 (2011).

360. Wu, Z. & McGoogan, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* **323**, 1239–1242 (2020).

361. Ra, C. & Wh, F. Thrombotic Complications of COVID-19 Infection: A Review. *Cardiology in review* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32947478/?dopt=Abstract (2021) doi:10.1097/CRD.0000000000000347.

362. M, H. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32142651/ (2020) doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.

363. M, A. *et al.* Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *The New England journal of medicine* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32437596/?dopt=Abstract (2020) doi:10.1056/NEJMoa2015432.

364. Z, V. *et al.* Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet (London, England)* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32325026/ (2020) doi:10.1016/S0140-6736(20)30937-5.

365. Hamming, I. *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* **203**, 631–637 (2004).

366. M, L. *et al.* Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32745993/?dopt=Abstract (2020) doi:10.1016/j.ebiom.2020.102925.

367. Goshua, G. *et al.* Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol* **7**, e575–e582 (2020).

368. Sinkovits, G. *et al.* Complement Overactivation and Consumption Predicts In-Hospital Mortality in SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol* **12**, 663187 (2021).

369. Yu, J. *et al.* Direct activation of the alternative complement pathway by SARS-CoV-2 spike proteins is blocked by factor D inhibition. *Blood* **136**, 2080–2089 (2020).

370. A, D. *et al.* Vascular Endothelial Damage in the Pathogenesis of Organ Injury in Severe COVID-19. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*

http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33626910/?dopt=Abstract (2021) doi:10.1161/ATVBAHA.120.315595.

371. Guervilly, C. *et al.* Circulating Endothelial Cells as a Marker of Endothelial Injury in Severe COVID -19. *J Infect Dis* **222**, 1789–1793 (2020).

372. Falcinelli, E. *et al.* Role of endothelial dysfunction in the thrombotic complications of COVID-19 patients. *J Infect* **82**, 186–230 (2021).

373. Cm, F. *et al.* Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15897343/ (2005) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.510461.

374. Rs, J. *et al.* Efficacy and Safety of LY3127804, an Anti-Angiopoietin-2 Antibody, in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial in Patients Hospitalized with Pneumonia and Presumed or Confirmed COVID-19. *Clinical medicine insights. Circulatory, respiratory and pulmonary medicine* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35991210/ (2022) doi:10.1177/11795484221119316.

375. J, P. *et al.* Efficacy and tolerability of bevacizumab in patients with severe Covid-19. *Nature communications* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33547300/ (2021) doi:10.1038/s41467-021-21085-8.

376. Martinelli, N. *et al.* A relative ADAMTS13 deficiency supports the presence of a secondary microangiopathy in COVID 19. *Thromb Res* **193**, 170–172 (2020).

377. Iba, T., Levy, J. H., Levi, M., Connors, J. M. & Thachil, J. Coagulopathy of Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Med* **48**, 1358–1364 (2020).

378. Guervilly, C. *et al.* Dissemination of extreme levels of extracellular vesicles: tissue factor activity in patients with severe COVID-19. *Blood Adv* **5**, 628–634 (2021).

379. Vallier, L. *et al.* Increasing the sensitivity of the human microvesicle tissue factor activity assay. *Thromb Res* **182**, 64–74 (2019).

380. Hottz, E. D. *et al.* Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood* **136**, 1330–1341 (2020).

381. Bonaventura, A. *et al.* Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol* **21**, 319–329 (2021).

382. Jr, T. *et al.* Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell* http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21925319/ (2011) doi:10.1016/j.cell.2011.08.015.

383. Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 34–45 (2013).

384. Gleeson, T. A. *et al.* Looking into the IL-1 of the storm: are inflammasomes the link between immunothrombosis and hyperinflammation in cytokine storm syndromes? *Discovery Immunology* **1**, kyac005 (2022).

385. Dinarello, C. A. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **15**, 612–632 (2019).

386. Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M. & Garlanda, C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity* **50**, 778–795 (2019).

387. Berda-Haddad, Y. *et al.* Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1α. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20684–20689 (2011).

388. Rothmeier, A. S. *et al.* Caspase-1-mediated pathway promotes generation of thromboinflammatory microparticles. *J Clin Invest* **125**, 1471–1484 (2015).

389. Zhang, Y. *et al.* CIRCULATING MICROPARTICLES, BLOOD CELLS, AND ENDOTHELIUM INDUCE PROCOAGULANT ACTIVITY IN SEPSIS THROUGH PHOSPHATIDYLSERINE EXPOSURE. *Shock* **45**, 299–307 (2016).

390. Yang, X. *et al.* Bacterial Endotoxin Activates the Coagulation Cascade through Gasdermin D-Dependent Phosphatidylserine Exposure. *Immunity* **51**, 983-996.e6 (2019).

391. G, S. *et al.* Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Science immunology* **3**, (2018).

392. Campos, J. *et al.* Neutrophil extracellular traps and inflammasomes cooperatively promote venous thrombosis in mice. *Blood Adv* **5**, 2319–2324 (2021).

393. Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation - PubMed. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27126649/.

394. Toldo, S. *et al.* Targeting the NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther* **236**, 108053 (2022).

395. Liao, M. *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med* **26**, 842–844 (2020).

396. Mehta, P. *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* **395**, 1033–1034 (2020).

397. Buckley, L. F. *et al.* Role for Anti-Cytokine Therapies in Severe Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Explor* **2**, e0178 (2020).

398. Rodrigues, T. S. *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med* **218**, e20201707 (2021).

399. Henry, B. M., de Oliveira, M. H. S., Benoit, S., Plebani, M. & Lippi, G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* **58**, 1021–1028 (2020).

400. Levi, M. & van der Poll, T. Coagulation and sepsis. *Thromb Res* **149**, 38–44 (2017).

401. Blanco-Melo, D. *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* **181**, 1036-1045.e9 (2020).

402. Bastard, P. *et al.* Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, eabd4585 (2020).

403. Hadjadj, J. *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* **369**, 718–724 (2020).

404. de Rivero Vaccari, J. C., Dietrich, W. D., Keane, R. W. & de Rivero Vaccari, J. P. The Inflammasome in Times of COVID-19. *Front Immunol* **11**, 583373 (2020).

405. Siddiqi, H. K. & Mehra, M. R. COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. *J Heart Lung Transplant* (2020) doi:10.1016/j.healun.2020.03.012.

406. Cavalli, G. & Dinarello, C. A. Anakinra Therapy for Non-cancer Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol* **9**, 1157 (2018).

407. Grom, A. A., Horne, A. & De Benedetti, F. Macrophage activation syndrome in the era of biologic therapy. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 259–268 (2016).

408. Huet, T. *et al.* Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study. *Lancet Rheumatol* **2**, e393–e400 (2020).

409. Kyriazopoulou, E. *et al.* Early treatment of COVID-19 with anakinra guided by soluble urokinase plasminogen receptor plasma levels: a double-blind, randomized controlled phase 3 trial. *Nat Med* (2021) doi:10.1038/s41591-021-01499-z.

410. Kyriazopoulou, E. *et al.* Effect of anakinra on mortality in patients with COVID-19: a systematic review and patient-level meta-analysis. *Lancet Rheumatol* **3**, e690–e697 (2021).

411. Dahms, K. *et al.* Anakinra for the treatment of COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Med Res* **28**, 100 (2023).

412. Kalil, A. C. *et al.* Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 795–807 (2021).

413. RECOVERY Collaborative Group *et al.* Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 693–704 (2021).

414. RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet* **397**, 1637–1645 (2021).

415. Salvarani, C. *et al.* Effect of Tocilizumab vs Standard Care on Clinical Worsening in Patients Hospitalized With COVID-19 Pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med* **181**, 24–31 (2021).

416. Zhang, J.-J. *et al.* Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy* **75**, 1730–1741 (2020).

417. Du, Y. *et al.* Clinical Features of 85 Fatal Cases of COVID-19 from Wuhan. A Retrospective Observational Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **201**, 1372–1379 (2020).

418. Coppo, P., Cuker, A. & George, J. N. Thrombotic thrombocytopenic purpura: Toward targeted therapy and precision medicine. *Res Pract Thromb Haemost* **3**, 26–37 (2019).

419. Hou, C. *et al.* In vivo activity of a phospholipase C inhibitor, 1-(6-((17beta-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione (U73122), in acute and chronic inflammatory reactions. *J Pharmacol Exp Ther* **309**, 697–704 (2004).